

## Ricerca simultanea della termonucleasi e della coagulasi negli alimenti

CLAUDIO DE SIMONE, SILVANA GIZZARELLI, LAURA TOTI e GIORDANO DE FELIP

Laboratorio degli Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - È descritta una tecnica di semplice esecuzione, idonea alla contemporanea evidenziazione della coagulasi e termonucleasi stafilococciche, direttamente in alimenti inquinati con ceppi enterotossici di *S. aureus*. Le prove condotte con la tecnica descritta hanno fornito risultati positivi negli alimenti, caratterizzati da una carica microbica saprofitaria iniziale non troppo elevata, dimostrando, altresì, che la suddetta microflora saprofitaria, anche quando raggiunge concentrazioni elevate, non dà luogo a falsi risultati positivi. Sono, inoltre, riportati i risultati degli studi inerenti alle caratteristiche di crono, termo-stabilità e acido-resistenza della coagulasi stafilococcica. Vengono, infine, illustrate le prove condotte al fine di evidenziare l'eventuale azione inibente sull'attività coagulastica da parte di vari microrganismi.

**Summary** (Enzyme Determination as Indirect Evidence for the Presence of Enterotoxic Staphylococci in Food Stuffs). - A simple direct test for the simultaneous detection of staphylococcal coagulase and thermonuclease in food-stuffs contaminated by enterotoxic strains of *S. aureus* is described. The tests carried out gave positive results in food-stuffs characterized by an initial saprophytic load which was not very high, showing, moreover, that the above saprophytic microflora, even in high concentration does not give rise to false positive results.

### INTRODUZIONE.

Negli ultimi anni si è andata sempre più delineando la stretta correlazione esistente tra produzione di enterotossina e quella di altri enzimi, con particolare riferimento alla coagulasi ed alla DNAsi termoresistente (termonucleasi), da parte di ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus* [7, 6, 11, 12]. È noto, d'altra parte, che la ricerca dell'enterotossina negli alimenti si basa, allo stato attuale delle ricerche, su tutta una serie di metodiche lunghe e costose, qualora si prospettasse un loro impiego routinario [3, 5, 12]; tali considerazioni, pertanto, hanno condotto ad una sempre più ampia utilizzazione della ricerca della termonucleasi quale indice indiretto della presenza dell'enterotossina nell'alimento [3, 12].

Recentemente, alcuni Autori [9] hanno evidenziato che quantità spettrofotometricamente rilevabili di nucleasi ( $0,34 \mu$ ) corrispondono a livelli di enterotossina ( $9,5 \cdot 10^8$  mcg), non ancora in grado di dare origine

ai sintomi caratteristici della gastroenterite stafilococcica. Tuttavia, benché la correlazione esistente tra la presenza della termonucleasi e quella dell'enterotossina sia molto elevata [6], appare evidente l'utilità di pervenire, contemporaneamente, anche alla determinazione nell'alimento in esame di un altro enzima caratteristico dei ceppi patogeni di *S. aureus* [1]. Per tale motivo e allo scopo di acquisire, sotto un profilo igienico, ulteriori elementi analitici che consentano di formulare giudizi più articolati sulla idoneità di un alimento, ci è sembrato opportuno prendere in esame la coagulasi, enzima già largamente usato quale indice di patogenicità degli stafilococchi e la cui ricerca viene attualmente condotta soltanto previo isolamento in coltura pura del germe produttore [14, 16]. A tal fine, abbiamo svolto tutta una serie di indagini preliminari, tendenti, da un lato, a mettere a punto una tecnica idonea alla ricerca diretta della coagulasi nell'alimento stesso e, dall'altro, ad evidenziare eventuali caratteristiche di termo e crono-stabilità del suddetto enzima; la conoscenza di tali caratteristiche, infatti, ci è sembrata necessaria per meglio chiarire il significato della ricerca della coagulasi stafilococcica direttamente nell'alimento. Sono state eseguite, infine, ulteriori ricerche intese ad evidenziare sia le caratteristiche di acido-resistenza della coagulasi, sia l'esistenza di eventuali fenomeni di inattivazione da parte di alcuni microrganismi.

### MATERIALI.

Ceppi batterici: *Staphylococcus aureus* (Thames Polytech, Londra) Produttore di enterotossina A; *Staphylococcus aureus* (Thames Polytech, Londra) Produttore di enterotossina B; *Staphylococcus aureus* ATCC 12610 - produttore di enterotossina A e C; *Bacillus subtilis* ATCC 9799; *Escherichia coli* ATCC 12015; *Micrococcus flavus* ATCC 10240; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; *Sarcina lutea* ATCC 9341; *Streptococcus faecalis* ISS S5001/A.

**Terreni di coltura:** Brodo Comune (Difco); Brain Heart Infusion (Difco); Baird-Parker (Oxoid).

**Substrati:** Bacto Coagulase Plasma (Difco) liofilizzato e reidratato; Substrato per la termonucleasi (Bacto DNA, g 0,3; NaCl, g 10; Agar granulare, g 10; Tampone Tris pH 9, q.b. a ml 1000).

**Reagenti:** Blu di toluidina 0,1 M; Tamponc Tris pH 8; Acido tartarico 1 N; Idrossido di potassio 1 N; Solfato di ammonio.

Microcilindri di porcellana (diametro del foro capillare mm 1,8; capacità ml 0,01).

Membrane Millipore, diametro pori 0,45; Filtro Scitz.

Centrifuga T24 Janetzki.

Coulter Counter Electronics Ltd, modello ZF.

Stomacher Lab. Blender 400 (PBI).

Alimenti usati (prelevati dal commercio): carne in scatola, wurstel, insaccati freschi, tonno sott'olio.

## METODI.

Le indagini sono state condotte su campioni di carne in scatola, wurstel, tonno sott'olio, insaccati freschi e carne fresca macinata: su tutti i campioni venivano preliminarmente determinati la carica microbica in germi saprofiti, la colimetria, il titolo in streptococchi fecali ed il contenuto in stafilococchi. Per quanto concerne quest'ultima caratteristica, venivano eliminati i campioni contenenti stafilococchi. Gli alimenti di cui sopra sono stati inoculati, rispettivamente, con brodo-culture di 24 h di ceppi di stafilococchi produttori di enterotossine A, B e C, accuratamente standardizzate al Coulter Counter, in modo da ottenere concentrazioni finali di  $10^4$  cellule di stafilococco/g; dopo la contaminazione i campioni in esame sono stati posti ad incubare per 48 h a 20° C ed a 37° C, indi sottoposti alla ricerca della termonucleasi ed a quella della coagulasi, impiegando il seguente schema analitico:

- omogeneizzatore, mediante Stomacher, di grammi 40 dell'alimento in esame con ml 80 di acqua distillata sterile;

- centrifugazione dell'omogenato a 5.000 r.p.m. per 30';

- aggiunta al surnatante del 30% (w/v) di solfato di ammonio e suo stoccaggio a + 4° C per 48 h;

- centrifugazione della sospensione suddetta a 5.000 r.p.m. per 30 min;

- raccolta del precipitato con ml 2,5 di tampone TRIS pH 8;

- ricerca dell'attività coagulante di diluizioni scalari, ottenute per raddoppio dell'estratto acquoso così ottenuto, su plasma di coniglio.

Nel corso di ogni prova, ad una parte del prodotto in esame è stato aggiunto soltanto terreno culturale, in luogo della brodocoltura di stafilococchi: tale aliquota fungeva, così, da controllo. Parallelamente alla ricerca della coagulasi è stata costantemente condotta quella della termonucleasi con il metodo di Tatini e Coll. [16], da noi modificato.

Oltre alle prove descritte, ne sono state condotte altre per studiare, nei medesimi alimenti sopra indicati, la termo-stabilità e la crono-stabilità della coagulasi stafilococcica in essi presente. A tal fine, un'aliquota di tali alimenti, contaminati secondo le modalità descritte in precedenza, successivamente incubati a 37° C per 48 h e nei quali veniva accertata la presenza di coagulasi (controllo), venivano trattati, rispettivamente, a 110° C e a 120° C per 10 min; dopo tale trattamento, veniva nuovamente eseguita la ricerca della

coagulasi. La crono-stabilità della coagulasi stafilococcica formatasi negli alimenti veniva accertata, infine, su aliquote dei medesimi previamente contaminate, incubate a 37° C per 48 h e trattate a 110° C per 10 min, al fine di bloccare lo sviluppo del germe produttore. Tali aliquote venivano quindi lasciate a temperatura ambiente e sottoposte, infine, alla ricerca della coagulasi ad intervalli regolari di tempo (ogni 4 giorni), seguendo lo schema analitico descritto in precedenza. Le ricerche sulla crono-stabilità della coagulasi sono state condotte, in parallelo, anche su brodo-culture di stafilococchi enterotossici di 24 h, sottoposte a trattamento termico idoneo ad eliminare il germe produttore (110° C per 10 min) e mantenute a temperatura ambiente; ciò al fine di avere dei campioni di riferimento.

Le prove di acido-resistenza sono state condotte a partire da brodo-culture di 24 h di stafilococchi enterotossici, portate ai seguenti valori di pH: 2, 4, 6 e 9. Su tali campioni è stata eseguita la ricerca della coagulasi, impiegando plasma di coniglio (Difco); come controllo è stato utilizzato il plasma stesso, trattato ai suddetti valori di pH con l'impiego dei medesimi reagenti (acido tartarico 1 N e idrossido di potassio 1 N).

Per quanto riguarda le prove tendenti a evidenziare l'eventuale inattivazione dell'attività coagulastica da parte di altri microrganismi, si è proceduto nel modo seguente: brodo-culture di stafilococchi enterotossici, di 24 h, venivano trattate a 70° C per 30 min, al fine di uccidere il germe produttore; esse erano, in seguito, divise in due aliquote, una delle quali era saggiata come tale, mentre l'altra veniva sottoposta ad una centrifugazione a 5.000 r.p.m. per 10 min, allo scopo di eliminare le cellule batteriche. Entrambi i campioni così ottenuti venivano, in seguito, suddivisi in 6 aliquote di ml 5 ciascuna, alle quali erano rispettivamente addizionati ml 0,1 di brodo-culture di 24 h dei seguenti microrganismi: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* e *Sarcina lutea*. Si incubavano infine le aliquote a 32° C per 24 h. Trascorso tale periodo, veniva condotta la ricerca della coagulasi, la cui lettura era effettuata dopo 4 h e 24 h.

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

Gli studi da noi condotti, sia su alimenti previamente inoculati con ceppi enterotossici di *S. aureus* che su brodo-culture dei medesimi germi, hanno consentito di evidenziare quanto segue:

- negli alimenti esaminati non contaminati da stafilococchi non sono mai state messe in evidenza né la coagulasi né la termonucleasi;

- i due enzimi suddetti sono stati evidenziati in alimenti paucimicrobici, quali carni in scatola e wurstel, da noi sottoposti a contaminazione secondaria secondo le modalità sopra descritte; in particolare, l'estratto acquoso degli alimenti utilizzati per la ricerca della coagulasi è risultato attivo fino alla diluizione di 1:32 nei campioni di carne in scatola, mentre negli altri alimenti l'attività coagulastica degli estratti era evidenziabile fino alla diluizione di 1:16;

- negli alimenti ad elevata carica saprofitaria iniziale, la ricerca della termonucleasi è risultata positiva, mentre risultava negativa quella della coagulasi. Tali

risultati, verosimilmente, sono da correlare ad interferenze espletate dalla predetta microflora saprofitaria sulla coagulasi stessa;

- la coagulasi rimane attiva anche dopo che gli alimenti sono stati trattati a 120° C per 10 min;

- tale enzima risulta ancora evidenziabile negli alimenti dopo 20 giorni dalla loro contaminazione con stafilococchi;

- l'attività coagulastica risulta inibita sia a pH 2 che a pH 9, mentre è ancora rilevabile a pH 4;

- tra i germi da noi saggiati nessuno è risultato in grado di inibire l'attività coagulastica; solamente il *Bacillus subtilis* e la *Pseudomonas aeruginosa* hanno mostrato una apprezzabile interferenza, sia pure limitatamente alla brodo-coltura previamente centrifugata.

Per quanto concerne, invece, eventuali interferenze espletate dalla microflora saprofitaria sulla produzione di coagulasi e di termonucleasi da parte degli stafilococchi, è opportuno rilevare quanto segue. Innanzitutto, è stata constatata, nelle presenti ricerche, l'assenza di attività termonucleasica e coagulastica in alimenti con elevata carica microbica saprofitaria ma non contaminati da stafilococchi; quanto sopra, conferma quanto è stato già evidenziato da altri Autori [15] relativamente alla termonucleasi. Per quanto concerne, in particolare, l'interferenza esercitata da streptococchi fecali nei confronti della termonucleasi, la letteratura più recente indica una possibile degradazione di tale enzima solo in presenza di concentrazioni molto elevate di tali germi; questo fenomeno, in pratica, non è rilevabile neanche in alimenti di scarsa qualità igienica nei quali di solito il numero degli streptococchi fecali è elevato

ma non arriva a superare concentrazioni di poche migliaia per grammo. È bene rilevare, inoltre, che in letteratura è stata descritta [5] una interferenza degli streptococchi del gruppo D nella ricerca della coagulasi: tali germi, infatti, sarebbero in grado di coagulare il plasma citratato di coniglio, fornendo, in questo modo, falsi risultati positivi. Tale inconveniente, rilevabile peraltro esclusivamente nel caso di letture tardive della prova della coagulasi (24 h di incubazione) [5], viene superato impiegando plasma di coniglio addizionato con EDTA come anticoagulante, così come da noi fatto nelle presenti indagini.

Per quanto si riferisce, invece, alla negatività della ricerca della coagulasi in alimenti da noi inquinati con stafilococchi, ma caratterizzati da una carica microbica molto elevata, oltre 10<sup>7</sup> u.f.c./g di prodotto di germi saprofitari, si può ritenere che ciò sia da porre in relazione ai noti fenomeni di antagonismo microbico esistenti laddove le cariche microbiche siano molto elevate; infatti il contenuto in stafilococchi non riesce a superare, negli alimenti in questione, il numero di 10<sup>4</sup> germi/g di prodotto anche dopo 48 h di incubazione a 37° C; a tale concentrazione, il germe non è in grado di elaborare quantità significative di enzima, come da noi già evidenziate in indagini precedenti [3].

Da quanto finora esposto emerge che la ricerca diretta della coagulasi negli alimenti, eseguita con una metodica semplice come quella sopra riportata, consente all'analista, specialmente se condotta in parallelo con quella della termonucleasi, di avere ragguagli significativi sulla igienicità di un prodotto con specifico riferimento al suo contenuto in stafilococchi enterotossici; ciò si riferisce, in particolare, ad alimenti freschi o da consumarsi entro breve tempo, anche se preventivamente trattati al calore.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BOOTHBY, J., GENIGEORGIS, C. & FANELLI, M. J. 1979. Tandem coagulase/thermonuclease agar method for the detection of *S. aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 298-300.
2. CASMAN, E. P. & BENNET, R. W. 1965. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.* **13**: 181-189.
3. DE FELIP, G., DE SIMONE, C., TOTI, L. & GIZZARELLI, S. 1979. Thermonuclease and other enzymes produced by enterotoxigenic staphylococci. *International Symposium on Microbiological and Clinical Aspects of Streptococcal and Staphylococcal Infections*, June 1979.
4. DE FELIP, G., TOTI, L. & DE SIMONE, C. 1977. Ricerca delle termonucleasi stafilococciche in alimenti di varia natura. *Ann. Sclavo.* **19** (5): 1-11.
5. EVANS, J. B., BUETTNER, L. G. & NIVEN, C. F. 1952. Occurrence of streptococci that give a false-positive coagulase test. *J. Bacteriol.* **64**: 433-436.
6. GILBERT, R. J., WIENEKE, A., LANSER, J. & SIMKOVICOVA, M. 1972. Serological detection of enterotoxin in foods implicated in staphylococcal food-poisoning. *J. Hyg.* **70**: 755-762.
7. LACHICA, R. V. F. & ATCHINSON, F. W. 1973. Identification of *S. aureus* simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.* **25**: 496-499.
8. LACHICA, R. V. F., WEISA, K. F. & DEIBEL, H. 1969. Relationship among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *S. aureus*. *Appl. Microbiol.* **18**: 126-127.
9. JAY, J. M. 1978. Modern food microbiology. International Student Edition.
10. MEDWID, R. D. & GRANT, D. W. 1980. Inactivation of staphylococcal thermonuclease by an enzyme-like factor produced by *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *J. Food Protection.* **43** (3): 201-204.
11. MOOSDIJK VAN DE, A., MOSSEL, D. A. A. & POW, H. J. 1973. The use of coagulase as a thermostable index enzyme for the examination of foods suspected of containing staphyloenterotoxins. *Ann. Rept. Central Inst. Nutr. Res. Zeist, The Netherlands*.
12. NISKANEN, A. & KOIRANEN, L. 1977. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Protection.* **40** (8): 543-548.

13. NISKANEN, A. & LINDROTH, J. 1977. Suitability of the enzyme treatment and ammonium sulfate precipitation method for detection of staphylococcal enterotoxin from different foods. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **4**: 233-237.
14. RAYMAN, F., PARK, E., PHYLPETT, J. & TEDD, D. 1975. Reassessment of the coagulase and thermonuclease tests as means of identification *S. aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**: 451-454.
15. SPERBER, W. H. & TATINI, S. R. 1975. Interpretation of the coagulase test for identification *S. aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**: 502-505.
16. TATINI, S. R. & CORDS, B. R. 1973. Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. *J. Dairy Sci.* **56**: 1512-1515.
17. WĘGRZYŃOWICZ, Z., HECZKO, P. B., SEL SASZEWICZ, J., NEUGEBAUER, M. & PULVERER, G. 1979. Pseudocoagulase activity of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 15-18.

## Ricerca delle salmonelle negli alimenti mediante una tecnica di immunofluorescenza

LEUCIO OREFICE, LUCIANA CROCI, GABRIELLA SCUDERI (a), PATRIZIA PACELLI e GIORDANO DE FELIP

Laboratorio degli Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(a) Ospite del Laboratorio degli Alimenti.

**Riassunto.** - Viene proposta una metodologia idonea all'evidenziazione delle salmonelle negli alimenti, mediante immunofluorescenza indiretta (I.F.I.), caratterizzata, tra l'altro, dal ricorso ad un procedimento di controcolorazione finale con Blue Evans. La sensibilità e la rapidità della metodica adottata la rendono particolarmente adatta in sede di screening, specialmente per accertamenti su un elevato numero di campioni, nel controllo igienico-sanitario delle materie prime.

**Summary** (Detection of *Salmonella* sp. in Food by Means of Immunofluorescence). - Using the indirect immunofluorescence technique, the Authors suggest a method for detecting salmonellae in foods, which is characterized, among other things, by a final Blue Evans counterstain. By means of its quickness and sensitivity, this procedure is very useful for a screening work, particularly for the hygienic control of a great number of foods and raw material samples.

### INTRODUZIONE.

Gli attuali metodi di « routine » richiedono non meno di 5 giorni per giungere ad una evidenziazione dei batteri del genere *Salmonella* negli alimenti; negli ultimi anni, pertanto, si è sentita sempre più la necessità di ridurre i tempi di analisi per renderli idonei anche in sede di screening. A tale scopo, utilizzando la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (I.F.I.), sono state da noi condotte una serie di indagini tendenti anche a migliorarne la specificità e a renderla, il più possibile, economica. Infatti, un'applicazione estensiva di tale metodo, già noto per le sue caratteristiche di rapidità, semplicità e sensibilità [11], aveva trovato in passato seri ostacoli negli alti costi di attuazione e nel frequente verificarsi di risultati falsamente positivi, dovuti all'alta incidenza di reazioni crociate tra le salmonelle ed alcuni contaminanti occasionali o altri germi appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee.

La letteratura specializzata nel settore riporta numerosi lavori compiuti con l'ausilio della immunofluorescenza diretta [3-6], anche automatizzata [8] o semi-automatizzata [10], mentre il metodo indiretto risulta meno sperimentato. Nonostante la tecnica diretta presenti una maggiore rapidità ed una minore indagine, abbiamo preferito ricorrere a quella indiretta (I.F.I.), che permette di eseguire una tipizzazione pre-

liminare utilizzando sieri facilmente reperibili [7], con evidenti vantaggi sia dal punto di vista analitico che economico; nella metodica diretta, invece, è necessario ricorrere a tutta una vasta serie di sieri immuni, di costo elevato e di reperimento non agevole.

### MATERIALI.

Ceppi batterici: *B. subtilis* ATCC 9799; *B. cereus* ATCC 9639; *B. thuringiensis* ISS B1004/M; *E. coli* ATCC 12015; *L. casei* ISS L1003; *M. flavus* ATCC 10240; *Ps. aeruginosa* ATCC 10145; *Pr. mirabilis* ISS Pr3; *S. aureus* Thames Polytechnique Londra-Bergdoll strain 100; *S. typhimurium* ISS 1010; *S. typhimurium* ISS 1010/A; *S. enteritidis* ISS 1004.

**Terreni di coltura:** brodo comune; acqua peptonata; brodo selenito + cistina; terreno di Muller-Kauffmann.

**Materiale per immunofluorescenza:** Sieri anti-salmonella polivalenti I, II, III (Behring); Bacto Salmonella O Antiserum (Poly A-I e Vi) (Difco); FA Rabbit globulin anti-globulin (GOAT) (Difco); Bacto-FA Buffer pH 7,2 (Difco); FA mounting fluid pH 7,2 (Difco); Formalina tamponata (1 parte di formalina + 9 parti di tampone Tris pH 7,2); Bacto FA Kirkpatrick fixative, modified (Difco) (60 % etanolo - 30 % cloroformio - 10 % aldeide formica); Tampone fosfato isotonic con Tween 80 (Sclavo); Blue Evans (Merck).

**Apparecchiature:** Microscopio Olympus modello BH-RFL; Coulter Counter electronics Lt. Mod. ZF (Cap. 50 micron); Stomacher Lab. Blend 400 PBI.

### METODI.

Dopo una serie di prove preliminari, sono state apportate alla tecnica della I.F.I. alcune varianti tendenti a renderla più idonea agli scopi da noi prefissati.

I criteri seguiti durante le nostre indagini sono stati i seguenti:

1) Ai fini di una corretta fissazione dell'antigene è stata usata la soluzione di Kirkpatrick, con un tempo di contatto di circa 5 min.

Per quanto riguarda le diluizioni dei sieri anti-salmonella polivalenti, sono state scelte quelle comprese tra

1:4 e 1:8 con tempi di azione intorno a 20-25 min (a 37° C in ambiente umido), mentre per l'antiglobulina coniugata con fluorescina quelle comprese tra 1:8 e 1:16 con tempi di azione intorno a 10 min (a 37° C in ambiente umido). Oltre ai classici lavaggi intermedi in soluzione tampone, si sono eseguiti, immediatamente dopo, brevi lavaggi in acqua distillata, per asportare i residui salini recati dalla stessa soluzione tampone. Dopo ogni lavaggio, per accelerare i tempi di essiccamento, il preparato è stato sottoposto ad una corrente di aria calda a temperatura moderata (40-50° C per 5-8 min). Per il montaggio si è ricorso alla glicerina tamponata. È stata abbandonata l'idea della centrifugazione del terreno di partenza al fine di concentrare l'antigene, poiché aumentava eccessivamente la presenza di frustoli luminosi nel campo microscopico.

2) Diverse analisi sono state condotte sia a partire da alimenti artificialmente contaminati, che a partire da altri non manipolati, ma sospetti di contenere salmonelle. Per evidenziare la possibilità di reazioni crociate sono state allestite prove che includevano, sia singolarmente che sotto forma di mescolanza, diversi stipiti batterici scelti tra possibili contaminanti: *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *S. aureus*, *M. flavus*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *L. casei*. È stato saggiato anche il comportamento del *S. cerevisiae*. Per quanto riguarda i terreni di coltura, si sono avuti i migliori risultati utilizzando l'acqua peptonata seguita dal selenito con cistina, che notoriamente favorisce lo sviluppo selettivo delle salmonelle.

3) Allo scopo di attenuare i fenomeni di fluorescenza aspecifica è stata effettuata una «controcolorazione», immergendo il preparato, prima del montaggio, in una soluzione di Blue Evans alla concentrazione di 1 mg/l per un tempo di 10 min. Pur non costituendo una novità, non risulta in letteratura l'impiego di tale colorante per lo stesso fine. Infatti, Fantasia e Coll. hanno sperimentato, unicamente per gli stafilococchi, il Flazo-orange [3], che maschera, però, solo i falsi positivi a fluorescenza più debole. È stata, infine, esaminata l'opportunità di impiegare antibiotici nei terreni di arricchimento, per ottenere una maggiore concentrazione di salmonelle a scapito di altri germi inquinanti.

#### RISULTATI.

1) Le scelte fatte hanno permesso di ottenere una buona fluorescenza dell'antigene specifico, con una fluorescenza di fondo scarsa o comunque non fastidiosa.

2) Lo *S. aureus* è risultato nettamente fluorescente, anche se non posto a contatto con il siero anti-salmonella. Ciò si è verificato, talora, anche per alcuni bacilli Gram positivi sottoposti alla prova, seppure in maniera meno vistosa, e per il *S. cerevisiae*. Le rimanenti

specie microbiche, compreso l'*E. coli*, hanno dato risultati incerti e variabili, a seconda di minimi cambiamenti delle condizioni sperimentali. È stato inoltre appurato che i fenomeni di interferenza non erano dovuti a diversi procedimenti di fissaggio.

3) Dopo il trattamento con Blue Evans, pur persistendo la fluorescenza dello *S. aureus*, tutti gli altri germi, tranne le salmonelle, risultavano avere una fluorescenza indebolita; l'attenuazione di quella del *B. subtilis* era però scarsa.

Prove preliminari con alcuni antibiotici nei terreni di arricchimento hanno fatto intravedere un utile impiego della cloxacillina. La penicillina non è risultata sufficientemente selettiva.

#### CONCLUSIONI.

La letteratura riporta percentuali di falsi negativi trascurabili (0-1,6%), eccettuato per alcuni alimenti, come la farina di carne. Le percentuali di falsi positivi sono comprese fra l'1% ed il 15% (con una media del 7%), e risultano più elevate nei campioni di pollame e nei salumi, ove la flora accessoria è spesso ricca [1, 3, 11].

Le frequenti false positività date da *C. freundii* (25-50%) [3] non dovrebbero preoccuparci eccessivamente, a causa della scarsa frequenza con cui tale germe si trova negli alimenti più comunemente analizzati, né ci dovrebbero preoccupare quelle date da germi morfologicamente distinguibili dalle salmonelle, quali *S. aureus* [9, 11] gli streptococchi ed il *S. cerevisiae*. D'altra parte sono tollerabili in sede di screening, ove è necessario solo escludere la presenza di salmonelle, ma non affermarne con certezza la stessa. È tuttavia possibile ridurre con alcuni accorgimenti l'incidenza dei falsi positivi, ad esempio adoperando sieri altamente purificati e dando la preferenza alle diluizioni più spinte [2] ed ai tempi di contatto più brevi, che non comportino un aumento rilevante dei falsi negativi. Inoltre, poiché un prearricchimento appare necessario quando si parte dall'analisi di un alimento, specie se è stato sottoposto ad un processo di conservazione, è bene mettere in atto meccanismi selettivi a favore delle salmonelle. A tal fine, la combinazione di un prearricchimento con acqua peptonata e selenito più cistina con una controcolorazione con Blue Evans sembra dare risultati soddisfacenti e comunque permette di condurre le prove di screening in tre giorni.

Per quanto concerne gli sviluppi successivi delle indagini ci proponiamo di sperimentare, tra l'altro, l'impiego di un antibiotico il più efficace possibile ai fini della selettività dei terreni di coltura, nonché lo studio di altri marcatori di fluorescenza, ai fini di una più accentuata elettività della prova.

#### BIBLIOGRAFIA

1. AYRES, J. C. 1967. Use of fluorescent antibody for the rapid detection of enteric organism in egg, poultry & meat products. *Food Technol.* **21**: 631-640.
2. BASSIOUNI, A. & PALLIOLA, E. 1970. La tecnica di immunofluorescenza nella diagnostica della salmonellosi sperimentale dei polli. *Vet. Ital.* **21**: 3-32.
3. FANTASIA, L. D., SCHRADE, J. P. & AL. 1975. Fluorescent antibody method for the detection of salmonella: development, evaluation and collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**: 828-844.



Foto eseguita al microscopio Olympus Mod. BH-RFL 1200X. *S. typhimurium* ISS 1010 marcata con antiglobulina coniugata con isotiocianato di fluorescina

4. GOEFFERT, J. M. & INSALATA, N. F. 1969. Salmonellae and the fluorescent antibody technique: a current evaluation. *J. Milk Food Technol.* **32**: 465-473.
5. INSALATA, N. F., SCHULTE, S. J. & BERMAN, J. H. 1967. Immunofluorescence technique for detection of *Salmonellae* in various foods. *Appl. Microbiol.* **15**: 1145-1149.
6. INSALATA, N. F., MAHNKE, C. W. & DUNLAP, W. G. 1972. Rapid, direct fluorescent antibody method for the detection of *Salmonellae* in food and feeds. *Appl. Microbiol.* **24**: 645-649.
7. JAY, M. 1978. *Modern Food Microbiology* 2th ed. New York, International Student Edition.
8. MUNSON, T. E., SCHRADER, J. P. & AL. 1976. Evaluation of an automated fluorescent antibody procedure for detection of *Salmonellae* in foods and feeds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 514-521.
9. SWAMINATHAN, B., AYRES, J. C. & WILLIAMS, J. E. 1978. Control of nonspecific staining in the fluorescent antibody technique for the detection of *Salmonellae* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 911-919.
10. THOMASON, B. M., HERBERT, G. A. & CHERRY, W. B. 1975. Evaluation of a semiautomated system for direct fluorescent antibody detection of *Salmonellae*. *Appl. Microbiol.* **30**: 557-564.
11. THOMASON, B. M. 1980. Current status of immunofluorescent methodology for *Salmonellae*. *J. Food Protection.* **44**: 381-384.

## Incidenza di *Candida* sp. nei soggetti sottoposti a trapianto di rene

MARIA CRISTINA GHEZZI, ALESSANDRA GIORDANO, PAOLA CIPRIANI e MARIA IMMACOLATA BRENCIAGLIA

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

**Riassunto.** - Gli Autori descrivono l'iter diagnostico relativo all'isolamento e identificazione di Lieviti tipo *Candida* sp. in pazienti immunocompromessi. L'indagine è stata eseguita su 63 trapiantati renali durante il periodo Gennaio-Ottobre 1981. L'esame microbiologico dei campioni (urina, espettorato, tampone vaginale, feci, tampone faringeo, sangue, ecc.) veniva eseguito prima e dopo il trapianto. L'identificazione dei ceppi isolati era effettuata mediante prove colturali e biochimiche. Sono stati inoltre saggiati, nei confronti dei 50 ceppi isolati, 4 composti antifungini (5-Fluorocitosina, Amphotericina B, Miconazolo, Nistatina) mediante il metodo della diluizione in brodo (M.I.C. e M.F.C.). Si è visto che il 47,6% dei trapiantati renali aveva avuto contaminazioni in una o più sedi e che il 60% dei ceppi isolati apparteneva alla specie *C. albicans*.

**Summary** (Incidence of *Candida* sp. in Kidney-transplanted Patients). - The Authors describe the diagnostic procedure relative to isolation and identification of *Candida* sp. in compromised host. The investigation was carried out on 63 renal-transplanted patients during the period January-October 1981. The microbiological examination of specimens (urine, sputum, vagina, stool, pharynx, blood, etc.) was carried out before and after transplantation. Isolated strains were identified using cultural and biochemical tests. The 50 isolated strains were also tested against four antifungal compounds (5-Fluorocytosine, Amphotericin B, Miconazole, Nystatin) by broth dilution method (M.I.C. and M.F.C.). We have found that 47,6% of renal transplant recipients were contaminated at one or more sites and that 60% of isolated strains were *C. albicans*.

I lieviti tipo *Candida* sono frequentemente presenti come membri della normale flora del tratto gastrointestinale, della pelle e, come contaminanti, nella vagina, nell'orofaringe e nell'urina in pazienti cateterizzati. Più frequenti sono le contaminazioni da parte di tali microrganismi quando vi sono condizioni predisponenti, quali si verificano in pazienti sottoposti a protratta terapia antibiotica, lunga degenza ospedaliera, in neoplastici, compresi i leucemici, e in soggetti sottoposti a trapianto d'organo. In questi ultimi, la terapia immuno-soppressiva costituisce una delle più importanti condizioni predisponenti per l'instaurarsi di colonizzazioni ed eventuali conseguenti infezioni. È noto che in tutti questi pazienti, la maggior parte delle infezioni da funghi è di origine endogena, e nei trapianti renali,

le sedi maggiormente interessate sono costituite dai polmoni, dal tratto urinario e dalla ferita. Alcuni Autori riportano che il 51% di tali pazienti presenta colonizzazioni, infezioni localizzate o generalizzate da *Candida* e il 70% ha candiduria [1]. Sempre questi Autori rilevano nella loro casistica una significativa correlazione tra infezioni fungine e rigetto, ipotizzando che ciò sia in relazione con l'uso di alti dosaggi di prednisone e di siero antilinfocitario. Tra le varie specie, la *Candida albicans* è responsabile di infezioni con maggiore frequenza, seguono poi le altre specie quali la *C. stellatoidea*, la *C. parapsilosis*, la *C. tropicalis* e la *C. krusei*. Nel periodo gennaio-ottobre 1981 abbiamo eseguito il controllo microbiologico di 63 pazienti sottoposti a trapianto di rene presso la II Patologia Speciale Chirurgica dell'Università di Roma, secondo un protocollo che prevede l'esame microbiologico prima dell'intervento e, con frequenza settimanale nel primo periodo post-trapianto, di tampone faringeo, espettorato, urina, secreto vaginale, feci, drenaggi e, se necessario, aspirato bronchiale, liquor, sangue.

### MATERIALI E METODI.

La ricerca della *Candida* nei campioni provenienti dai pazienti sottoposti a trapianto di rene è stata effettuata mediante la semina su Sabouraud agar e Sabouraud agar addizionato con cloramfenicolo (0,05 mg/ml). I ceppi isolati sono stati tipizzati in base alle prove colturali e biochimiche riportate nella Tab. 1. La formazione della pellicola superficiale è stata eseguita in Sabouraud brodo; la formazione del tubo germinativo in siero di cavallo e nello stesso con l'aggiunta di N-acetil-glucosamina come stimolatore [2]; la formazione delle clamidospore su Corn Meal Agar (BBL). Per la fermentazione è stato usato Cystine Trypticase Agar (BBL) con l'aggiunta di dischetti impregnati dei vari zuccheri (Taxo Carbohydrate Discs) (BBL) e per le prove di assimilazione lo Yeast Nitrogen Base (BBL) secondo Wickerham [3]. Infine, la resistenza al cicloesimide è stata saggiata mediante semina su Sabouraud addizionato con cicloesimide (10 µg/ml Acti-dione Upjohn). È stata inoltre studiata la sensibilità dei ceppi di *Candida* isolati ai seguenti farmaci antimicotici: amphotericina B (Squibb), miconazolo (Jansen), nistatina (Squibb) e 5-fluorocitosina (La Roche).

Tabella 1. - Schema per l'identificazione di *Candida*.

Prove colturali ...	}	Formazione della pellicola		
		Formazione del tubo germinativo		
		Formazione delle clamidospore		
Prove biochimiche	}	Fermentazione di	Galattosio	
			Saccarosio	
			Maltosio	
			Glucosio	
			Lattosio	
	}	Assimilazione di	Inositolo	Trealosio
			Lattosio	Melibiosio
			Glucosio	Cellobiosio
			Saccarosio	Raffinosio
			Dulcitolio	Maltosio
			Xilosio	Galattosio
			Resistenza al Cicloesimide	
	Produzione di Ureasi			

Per quanto riguarda lo studio della sensibilità ai farmaci antimicotici sono state calcolate le M.I.C. (Minima Concentrazione Inibente) con il metodo della diluizione in terreno liquido e le M.F.C. (Minime Concentrazioni Fungicide) mediante la subcoltura delle concentrazioni maggiori o uguali alla inibente in Sabouraud agar senza antibiotici. Come terreno è stato usato lo Yeast Nitrogen Base addizionato di glucosio (1%) e di asparagina (0,4 g/l) tamponato a pH 7. Per l'inoculo sono state utilizzate sospensioni in soluzione fisiologica, ottenute da colture di 48 ore su Sabouraud agar, con una concentrazione di  $10^6$  cellule/ml.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI.

In 30 pazienti, pari al 47,6% è stata isolata la *Candida* in una o più sedi dell'organismo. Come si può osservare dalla Tab. 2, le alte vie aeree rappresentano la sede che con maggiore frequenza risulta colonizzata, come pure abbastanza elevata è la percentuale di candiduria osservata.

Nella nostra indagine abbiamo isolato 50 ceppi di *Candida* sp. dai 30 pazienti esaminati, in quanto alcuni di questi presentavano contaminazioni in più sedi dell'organismo; in 5 casi sono state isolate 2 specie diverse dallo stesso paziente. In base alle prove colturali e biochimiche, le *Candide* isolate (Tab. 3) sono risultate: 30 *C. albicans*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. stellatoidea*, 2 *C. krusei*, 2 *C. pseudotropicalis*, ed inoltre 3 appartenenti al genere *Torulopsis*: 2 *T. glabrata* e 1 *T. pinto-*

Tabella 2. - Sedi di isolamento di 50 *Candida* sp. in 30 (47,6%) pazienti trapiantati nel periodo gennaio-ottobre 1981.

Alte vie aeree .....	22 (44%)
Tratto genitale .....	11 (22%)
Tratto urinario .....	9 (18%)
Intestino .....	6 (12%)
Altre sedi .....	2 (4%)
(ferita, redon, fistole, ecc.)	

Tabella 3. - Specie di *Candida* isolate.

<i>C. albicans</i> .....	30
<i>C. parapsilosis</i> .....	8
<i>C. stellatoidea</i> .....	5
<i>C. krusei</i> .....	2
<i>C. pseudotropicalis</i> .....	2
<i>C. glabrata</i> .....	2
<i>C. pinto-lopessii</i> .....	1

*lopessii*, che secondo le ultime divisioni tassonomiche sono considerati appartenere al genere *Candida* [4]. I risultati ottenuti nelle prove di sensibilità sono riportati nella Tab. 4. Tutti gli antimicotici saggiati hanno un range di attività piuttosto ampio, nella maggioranza dei casi si è avuta attività fungicida, tranne per il Micconazolo nei confronti di ceppi di *C. albicans* e *C. stellatoidea* e per la 5-Fluorocitosina nei confronti di *C. parapsilosis* e delle *Candide* dell'ultimo gruppo. I valori di M.I.C. per tutti i ceppi e per tutti i farmaci, tranne che per la 5-Fluorocitosina, sono piuttosto elevati, in particolare per le *Candide* non *albicans*. È interessante sottolineare alcuni punti dei risultati ottenuti: le percentuali di contaminazione da noi osservate nei pazienti oggetto del nostro studio sono analoghe a quelle riportate in letteratura, inoltre risulta evidente come, oltre alla *C. albicans*, rivestano un ruolo significativo le altre specie che più spesso risultano resistenti ai farmaci antimicotici. Inoltre i dati di M.I.C. e M.F.C. da noi ottenuti sono piuttosto elevati. Ciò può essere dovuto al fatto che, poiché più ceppi provengono dallo stesso paziente, è ipotizzabile che questi abbiano le stesse caratteristiche biologiche; pertanto, l'eventuale resistenza di questi ceppi ad uno o più farmaci, incide notevolmente sulla percentuale totale. Infine, dato che in letteratura non vi sono studi sulla sensibilità di ceppi di *Candida* sp. di analoga provenienza, è possibile che questi abbiano acquisito per selezione caratteristiche particolari.

Tabella 4. - Attività comparativa dell'Amphotericina B, della Nistatina, del Miconazolo e della 5-Fluorocitosina nei confronti di 50 ceppi di *Candida* sp.

SPECIE	Antimicotico	M. I. C.			M. F. C.		
		Range	50 %	90 %	Range	50 %	90 %
<i>C. albicans</i> (30) .....	Amphotericina B	0,02-10,00	0,80	2,50	0,039-10,00	1,44	4,60
	Nistatina	<0,05-25,00	3,70	11,30	<0,05-25,00	4,40	11,60
	Miconazolo	0,10-50,00	3,75	9,80	0,10-50,00	3,80	25,00
	5- Fluorocitosina	<0,05-50,00	0,34	6,25	<0,05-50,00	0,50	12,50
<i>C. parapsilosis</i> (8) .....	Amphotericina B	0,16-5,00	0,62	2,00	0,32-5,00	1,05	3,10
	Nistatina	1,56-12,50	2,20	7,15	3,12-12,50	2,70	7,15
	Miconazolo	0,39-12,50	3,12	8,00	0,39-12,50	3,12	10,90
	5- Fluorocitosina	0,20-25,00	1,56	15,40	0,20-> 100,00	12,50	43,50
<i>C. stellatoidea</i> (5) .....	Amphotericina B	1,25-5,00	1,87	3,70	2,50-10,00	2,03	3,70
	Nistatina	6,25-12,50	7,35	11,50	6,25-12,50	8,60	11,70
	Miconazolo	1,56-25,00	14,60	22,90	1,56-100,00	15,60	73,80
	5- Fluorocitosina	0,10-0,39	0,80	0,29	0,10-0,39	0,80	0,29
<i>C. krusei</i> (2) .....	Amphotericina B	0,32- 5,00	1,59	4,10	0,32-> 10,00	1,59	> 10,00
<i>C. pseudotropicalis</i> (2)	Nistatina	1,56-6,25	3,60	5,80	1,56-12,50	3,80	8,40
<i>C. glabrata</i> (2) .....	Miconazolo	0,39-12,50	2,40	8,40	0,39-12,50	3,80	8,40
<i>C. pintolopesii</i> (1) .....	5- Fluorocitosina	0,20-12,50	0,29	8,20	0,20-50,00	0,92	33,50

## BIBLIOGRAFIA

- BACH, M. C., SAHYOUN, A., ADLER, J. L., SCHLESINGER, R. M., BREMAN, J., MADRAS, P., PENG, F. & MONACO, A. P. 1973. High incidence of fungus infections in renal transplantation patients treated with antilymphocyte and conventional immunosuppression. *Transpl. Proc.* **V**: 549-553.
- SIMONETTI, N., STRIPPOLI, V. & CASSONE, A. 1974. Yeast-Mycelial conversion induced by N-acetil-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*. **250**: 344-346.
- WICKERHAM, L. H. & BURTON, K. A. 1958. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J. Bacteriol.* **56**: 363-371.
- YARROW, D. & MEYER, S. A. 1978. A proposal for the amendment of the diagnosis of genus *Candida* *Berkhout* nom. cons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 611-615.
- LENNETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER, W. J. JR. & TRUANT, J. P. 1980. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd Edition. Washington D.C., pp. 647-653.
- SOLOMKIN, J. S., M. D. & SIMMONS, R. L., M. D. 1980. *Candida* infection in surgical patient. *World J. Surg.* **4**: 381-384.
- COPE, J. E. 1980. Mode of action of Miconazole on *Candida albicans*: effect on growth, viability and K<sup>+</sup> release. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 245-251.
- GALE, E. F., JOHNSON, A. M., KERRIDGE, D., WAYMAN, F. 1980. Phenotypic resistance to Miconazole and Amphotericin B in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **117**: 535-538.
- NOBRE, G. N., PEREIRA, A., COIAS, R. & CORDEIRO, J. 1980. *In vitro* development of resistance to Nystatin by *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **118**: 263-265.
- EICKHOFF, T. C. 1973. Infectious complications in renal transplant recipients. *Transpl. Proc.* **V**: 1233-1237.
- ZAZGORNIK, J., SCHMIDT, P., KOPSA, H., THURNER, J. & DEUTSCH, E. 1979. Triple infections (fungal, bacterial and viral) in immunosuppressed renal transplant recipient. *Intern. Urology and Neph.* **11** (2): 145-150.

## Studio sull'attività antimicrobica del salicilato 8-chinolinilbenzoato

SALVATORE PANICO e NICOLA SIMONETTI

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

**Riassunto.** - Il chinolin-salicilato esercita un'attività antimicotica ed anche antibatterica. Tale attività aumenta con opportuni eccipienti. Non se ne conosce il meccanismo d'azione.

**Summary** (Antibacterial Activity of Salicylate 8-quinolinebenzoate). - The salicylate 8-quinolinebenzoate exerts an antimicrobial activity against yeasts (*Candida*, *Cryptococcus*) and hyphomycetes; is active, moreover, against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The activity of this compound increases with opportune excipients. There is question about the mechanism of action of this compound.

Il salicilato 8-chinolinilbenzoato è un antimicotico [1], del quale però non è noto lo spettro di attività. La sua azione antimicotica potrebbe essere messa in relazione alle caratteristiche della sua molecola contemporaneamente lipofila e ionica, tuttavia non è ancora conosciuto il meccanismo d'azione. È da ricordare che l'8-chinolinilbenzoato è stato studiato tra i fungicidi del suolo [2]. È altresì da tener presente la possibile azione antimicrobica del salicilato e del benzoato facenti parte della molecola [3].

Scopo del lavoro è quello di effettuare ricerche sui miceti e sui batteri Gram-positivi e Gram-negativi al fine di definire lo spettro di azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato, ed ottenere alcune valutazioni sul possibile meccanismo d'azione di questa sostanza.

### MATERIALI E METODI.

La sperimentazione è stata effettuata su numerosi ceppi di miceti e di batteri in genere isolati da materiale biologico. In particolare tra i miceti blastocellulari sono stati adoperati: 61 ceppi di *Candida albicans*; 30 ceppi appartenenti ad altre specie del genere *Candida* (9 *C. stellatoidea*, 6 *C. tropicalis*, 2 *C. pseudotropicalis*, 3 *C. guilliermondii*, 3 *C. macedoniensis*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. krusei*, 1 *C. utilis*, 4 *C. sp.*); 4 ceppi di *Cryptococcus neoformans*.

Tra i miceti filamentosi sono stati adoperati 6 ceppi del genere *Aspergillus*, 4 ceppi di *Trichophyton mentagrophytes* e 2 ceppi di *Microsporium canis*. Tra i ceppi batterici sono stati adoperati 26 ceppi di batteri Gram-positivi (11 ceppi di *Staphylococcus pyogenes* e 15 ceppi di *Streptococcus ovalis*) e 91 ceppi di batteri Gram-negativi di cui 31 appartenenti agli enterobatteri (9 ceppi

del genere *Salmonella*, 11 del genere *Klebsiella* e 11 ceppi di *Escherichia coli*), 39 ceppi del genere *Protens* (10 *P. mirabilis*, 11 *P. morgani*, 7 *P. rettgeri*, 7 *P. vulgaris*, 4 *Providencia*) e 21 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*. Le colture batteriche sono state seminate per le prove in DST (Diagnostic Sensitivity Test Agar, Oxoid).

Le colture dei miceti sono state seminate in Sabouraud. Il pH dei terreni nelle prove era portato a pH 7,2 e 5,8. La semina batterica è stata effettuata con le diluizioni di brodo-coltura di 18 ore di sviluppo in modo da ottenere un inoculo rispettivamente di  $2 \cdot 10^8$  batteri e  $10^4$  miceti blastocellulari. Nel caso dei miceti filamentosi l'inoculo proveniva da una coltura di 72 h. L'attività antimicrobica è stata studiata mediante valutazione della concentrazione minima inibente (M.I.C.). Negli esperimenti è stato adoperato il salicilato 8-chinolinilbenzoato. In alcuni esperimenti è stata studiata, inoltre, l'azione del metil e propilparaossibenzoato da solo ed in associazione con il salicilato 8-chinolinilbenzoato, e aggiunto in una pomata avente la seguente composizione:

Salicilato . . . . .	g 2
Lanolina . . . . .	g 0,5
Miri 45 . . . . .	g 2
Propil e metilparaossibenzoato . . . . .	g 0,013
Cera d'api giallo . . . . .	g 0,150
Spermaceti . . . . .	g 0,150
Olio di arachide . . . . .	g 0,650
Stearina . . . . .	g 0,500
Trietanolamina . . . . .	g 0,118
Butilidrossianisolo . . . . .	g 0,00625

La sostanza pura e la pomata erano disciolti in acetone in quantità non interferente lo sviluppo delle colture e poi si effettuavano diluizioni scalari nei terreni da esperimento. La lettura dei risultati era eseguita dopo incubazione di 18 h a 37 °C per i batteri, 36 h per i miceti blastocellulari e 60 h per i miceti filamentosi.

### RISULTATI.

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato sui miceti blastocellulari (Candida, Cryptococcus).* - Le esperienze effettuate a pH 5,8 (Tab. 1) hanno dimostrato una di-

Tabella 1. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato a pH 5,8 verso 84 ceppi di *Candida* (56 *C. albicans*, 9 *C. stellatoidea*, 5 *C. tropicalis*, 2 *C. psuedotropicalis*, 3 *C. macedoniensis*, 3 *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei*, 1 *C. parapsilosis*, 4 *Candida* sp.) e a pH 7,2 verso 85 ceppi (57 *C. albicans*, 28 *Candida* sp.); verso 4 ceppi a pH 5,8 e 3 ceppi a pH 7,2 di *C. neoformans*.

M. I. C. µg/ml	<i>Candida</i> sp.				<i>C. neoformans</i>			
	pH 5,8	%	pH 7,2	%	pH 5,8	%	pH 7,2	%
0,40	1	—	—	—	—	—	—	—
0,80	—	—	1	—	1	—	—	—
1,56	—	—	—	—	—	—	—	—
3,12	3+1	—	2+1	—	2+1	—	3	100
6,25	2+4	—	3+3	—	—	—	—	—
12,50	15+6	—	3+6	—	—	—	—	—
25,00	39+21	—	11+9	—	1+3	100	—	—
50,00	5+60	—	12+20	—	—	—	—	—
100,00	7+65	—	4+32	—	—	—	—	—
200,00	1+72	—	28+36	—	—	—	—	—
> 200,00	12	15	20	24	—	—	—	—
Ceppi sensibili $\bar{X}$	31,98	—	108,41	—	8	—	3,12	—

La lettura per la *Candida* sp. è stata effettuata dopo 18 h a 37°C.

La lettura per il *C. neoformans* è stata effettuata dopo 24 h a 37°C.

screta attività antimicotica del salicilato 8-chinolinilbenzoato verso l'85 % dei ceppi di *Candida* saggiati. Minore è invece l'attività a pH 7,2 che si esercita in maniera più limitata sul 76 % dei ceppi saggiati. Una notevole sensibilità è stata dimostrata dai *Criptococchi* saggiati sia a pH 5,8 sia a pH 7,2. Tutti i ceppi saggiati vengono inibiti entro 25 µg/ml a pH 5,8 ed entro 3,12 µg/ml a pH 7,2 (Tab. 2).

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato sugli ifomiceti.* - I ceppi saggiati sono risultati sensibili all'azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato: a pH 5,8 tutti i ceppi vengono inibiti entro la concentrazione di 100 µg/ml; a pH 7,2 il 96 % dei ceppi viene inibito entro 200 µg/ml.

Tabella 2. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato a pH 5,8 e pH 7,2 verso 12 ceppi di ifomiceti (6 ceppi di *A. fumigatus*, 4 ceppi di *T. mentagrophytes*, 2 ceppi di *M. canis*).

M. I. C. µg/ml	pH 5,8	pH 7,2
3,12	1	1
6,25	—	2+1
12,50	—	1+3
25,00	5+1	3+4
50,00	2+6	1+7
100,00	4+8	1+8
200,00	—	2+9
> 200,00	—	1
$\bar{X}$	52,34	54,42

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato verso i cocchi Gram-positivi (Staphylococcus pyogenes, Streptococcus ovalis).* - Tra i batteri Gram-positivi sono stati saggiati lo *Staphylococcus pyogenes* e lo *streptococcus ovalis*.

Sia a pH 5,8 che a pH 7,2 (Tab. 3) gli *stafilococchi* sono risultati notevolmente sensibili all'azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato. Gli *enterococchi* sono risultati sensibili soprattutto a pH 7,2 (Tab. 3). Tra tutti i ceppi Gram-positivi saggiati (Tab. 3) non si sono osservati ceppi con sensibilità superiore a 100 µg/ml.

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato verso i batteri Gram-negativi.* - I ceppi degli *enterobatteri* saggiati si sono rilevati limitatamente sensibili all'azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato sia a pH 5,8 che a pH 7,2 (Tab. 4). I ceppi appartenenti al genere *Proteus* e i ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* si sono rivelati scarsamente sensibili all'azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato. In particolare i ceppi con resistenza superiore a 800 µg/ml sono a pH 5,8 il 10 % dei ceppi saggiati nel genere *Proteus* ed il 47,6 % dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*; la percentuale di questi ceppi resistenti a pH 7,2 nel genere *Proteus* aumenta al 69 % e al 95 % con i ceppi di *Pseudomonas* (Tab. 5).

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato con aggiunta di propil e metilparaossibenzoato verso miceti blastocellulari.* - L'azione antimicotica del salicilato 8-chinolinilbenzoato viene aumentata dall'aggiunta di metil e propilparaossibenzoato, come risulta dalla Tab. 8, riferendosi ad esperimenti condotti a pH 7,2. Tale aumento viene esercitato anche dal propil e metilparaossibenzoato unito ad altri eccipienti presenti nella pomata precedentemente descritta.

*Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato con aggiunta di propil e metilparaossibenzoato verso gli ifomiceti.* - Come risulta dalla Tab. 8, la pomata contenente salicilato 8-chinolinilbenzoato presenta una buona attività che

Tabella 3. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato a pH 5,8 e pH 7,2 verso 11 ceppi di *Staphylococcus pyogenes* e verso 15 ceppi di *Streptococcus ovalis*.

M. I. C. µg/ml	<i>Staphylococcus pyogenes</i>				<i>Streptococcus ovalis</i>			
	pH 5,8	%	pH 7,2	%	pH 5,8	%	pH 7,2	%
1,56	—	—	1	—	—	—	—	—
3,12	—	—	1+1	—	—	—	—	—
6,25	1	—	—	—	—	—	—	—
12,50	5+1	—	7+2	—	7	—	7	—
25,00	5+6	100	—	—	2+7	—	6+7	—
50,00	—	—	2+9	100	2+9	73	2+13	100
100,00	—	—	—	—	4+11	—	—	—
Ceppi sensibili $\bar{X}$	17,61	—	17,47	—	42,5	—	22,5	—

Lettura effettuata dopo 18 h a 37 °C.

Tabella 4. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato a pH 5,8 e pH 7,2 su 31 ceppi di batteri Gram-negativi (9 Salmonelle, 11 Klebsielle, 11 Escherichia coli).

M.I.C. µg/ml	pH 5,8	%	pH 7,2	%
25	—	—	2	—
50	1	—	1+2	—
100	11+1	—	2+3	—
200	15+12	—	24+5	—
> 200	4	13	2	7
$\bar{X}$	153,7	—	175,8	—

Lettura effettuata dopo 18 h a 37 °C.

si esplica maggiormente a pH 7,2. Buona attività che si manifesta circa negli stessi valori medi a pH 7,2, con aggiunta di propil e metilparaossibenzoato.

Azione dell'associazione salicilato 8-chinolinilbenzoato e pomata contenente propril e metilparaossibenzoato verso miceti blastocellulari, ifomiceti, batteri Gram-positivi, Gram-negativi, *Proteus* e *Pseudomonas*. - Come risulta dalla Tab. 6, la pomata contenente salicilato 8-chinolinil-

benzoato presenta una buona attività antimicotica. Si nota, infatti, paragonando questi dati alla Tab. 1, riferentesi ai miceti blastocellulari, un aumento di attività che a pH 7,2 è circa 3 volte maggiore. Si nota, inoltre, la scomparsa dei ceppi con M.I.C. superiore a 200 µg/ml sia a pH 5,8 che a pH 7,2. Buona attività della pomata che, per gli ifomiceti, si esplica maggiormente a pH 7,2. Si può evidenziare, sempre nella Tab. 6, come la pomata esercita una buona attività antibatterica verso i ceppi di *Staphylococcus pyogenes* specialmente a pH 7,2, dove si ottiene una M.I.C. media di 2,59 µg/ml. Se si confrontano questi risultati con quelli riportati nella Tab. 3, si nota un aumento di attività che a pH 7,2 è di circa 7 volte. Nelle prove con i ceppi di *Streptococcus ovalis* si nota che l'attività antibatterica della pomata è ancora maggiore e se si confrontano questi risultati con quelli riportati nella Tab. 3, si nota un aumento di attività che, a pH 7,2, è di circa 10 volte.

Con gli enterobatteri (*E. coli*, *Klebsielle*, *Salmonelle*), la pomata contenente salicilato 8-chinolinilbenzoato presenta una discreta attività antibatterica. Se si confrontano questi risultati con quelli riportati nella Tab. 4, si nota un aumento di attività, che si estrinseca con la scomparsa di tutti i ceppi con M.I.C. superiore a 200 µg/ml e con un aumento di attività che, a pH

Tabella 5. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato a pH 5,8 e pH 7,2 verso 39 ceppi del genere *Proteus* (10 *P. mirabilis*, 11 *P. morgani*, 7 *P. rettgeri*, 7 *P. vulgaris*, 4 *Providencia*) e verso 21 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*.

M. I. C. µg/ml	<i>Proteus</i>				<i>Pseudomonas</i>			
	pH 5,8	%	pH 7,2	%	pH 5,8	%	pH 7,2	%
100	2	—	—	—	1	—	—	—
200	4+2	15,3	—	—	—	2,5	—	—
400	7+6	—	9	—	1+1	—	—	—
800	22+13	—	3+9	—	9+2	—	1	—
> 800	4	10	27	69	10	47,6	20	95

Lettura effettuata dopo 18 h a 37 °C.

Tabella 6. - Azione dell'associazione salicilato 8-chinolinilbenzoato + pomata contenente propil e metilparaossibenzoato.

GENERE	N. ceppi	M.I.C.		Ceppi resistenti 200 µg/ml	
		$\bar{X}$ pH 5,8	$\bar{X}$ pH 7,2	pH 5,8 %	pH 7,2 %
Candida	90	30,19	37,00	—	—
Ifomiceti	8	34,05	10,07	—	—
St. pyogenes	11	14,77	2,59	—	—
Str. ovalis	15	10,31	2,39	—	—
Gram - (KES)	31	75,80	45,96	—	—
Proteus	39	—	—	67	72
Pseudomonas	21	—	—	90,5	81

Tabella 7. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato con aggiunta di propil e metilparaossibenzoato (rapporto 1:1) verso 8 ceppi di ifomiceti (3 ceppi di *Aspergillus fumigatus*, 3 ceppi di *Trichophyton mentagrophytes*, 2 ceppi di *Microsporum canis*).

M.I.C. µg/ml	Sal 8-ch pH 7,2	Pomata pH 7,2	Sal 8-ch + propil e metilparaos- sibenzoato pH 7,2
3,12.....	—	3	3
6,25.....	—	1+3	1+3
12,50.....	1	2+4	1+4
25,00.....	3+1	2+6	3+5
50,00.....	—	—	—
100,00.....	1+4	—	—
200,00.....	3+5	—	—
$\bar{X}$ .....	60,93	10,07	12,88

7,2, è di circa 4 volte. Con i ceppi di *Proteus* e *Pseudomonas* la pomata presenta una modesta attività (Tab. 6). Tuttavia, se si confrontano questi risultati con quelli riportati nella Tab. 5, si osserva un notevole aumento di attività; infatti, a pH 7,2 con il genere *Proteus* i ceppi con M.I.C. superiore a 800 µg/ml diminuiscono di oltre 13 volte. Con i ceppi di *Pseudomonas* si ha una riduzione dal 95% al 38%.

Tabella 8. - Azione del salicilato 8-chinolinilbenzoato con aggiunta di propil e metilparaossibenzoato (rapporto 1:1) verso 53 ceppi del genere *Candida* (31 ceppi di *C. albicans*, 4 *C. stellatoidea*, 2 *C. macedoniensis*, 5 *C. tropicalis*, 1 *C. pseudotropicalis*, 2 *C. krusei*, 4 *C. guilliermondii*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. leuconii*, 1 *C. wiswattii*, 1 *C. utilis*).

M.I.C. µg/ml	Sal 8-ch pH 7,2	%	Pomata pH 7,2	%	Sal 8-ch + metilpropil- paraossiben- zoato pH 7,2	%
1,56.....	1	—	1	—	—	—
1,56.....	1+1	—	1+1	—	—	—
3,12.....	—	—	2+2	—	—	—
6,25.....	5+2	—	22+4	—	5	—
12,50.....	12+7	—	4+26	—	20+5	—
25,00.....	23+19	—	11+30	—	17+25	—
50,00.....	4+42	88	8+41	92	—	89
100,00.....	—	—	—	—	1+42	—
200,00.....	2+46	—	4+49	—	4+43	—
400,00.....	—	—	—	—	—	—
800,00.....	2+48	—	—	—	—	—
800,00.....	2+50	—	—	—	—	—
$\bar{X}$ .....	118,43	—	31,53	—	34,17	—

Lettura effettuata dopo 36 h a 37 °C.

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

Il salicilato 8-chinolinilbenzoato (Sal 8-ch) è un antimicotico attivo sia verso i miceti lieviformi che verso gli ifomiceti. Questa molecola è interessante, perché lo spettro d'azione si estende non solo ai batteri Gram-positivi ma anche ai Gram-negativi ed in particolare agli enterobatteri; sono poco sensibili, tuttavia, i ceppi di *Proteus* e *Pseudomonas*. È possibile che l'ampiezza dello spettro sia legata alla presenza nella molecola del salicilato e benzoato, le cui attività antimicrobiche sono note; infatti, è stato dimostrato che l'attività del Sal 8-ch può venire incrementata da parte di un benzoato. È interessante come l'attività del Sal 8-ch possa venire incrementata in preparati farmaceutici ed in particolare in una pomata da noi saggiata: la presenza di alcuni eccipienti come il propil e metilparaossibenzoato è alla base di questo incremento di attività del Sal 8-ch.

#### BIBLIOGRAFIA

1. *Medicamenta*, IV Ed. 1965. III: 1-2973.
2. TORGEON, D. C. 1967. *Fungicides*. Acad. Press. I: 1-209.
3. McCULLOCH, E. C. 1936. *Disinfection and sterilization*. H. Kimpton (Ed.). London, pp. 261-266.

## Valutazione di patogenicità di varie specie di *Cryptococcus* su topini normali e cortisonizzati

LORENZO TUTTOBELLO (a), FLAVIA DE BERNARDIS (a), LUISELLA MORELLI (b),  
FRANCESCO FRATONI (a) e ENNIO PALLIOLA (b)

(a) Servizio Biologico; (b) Laboratorio di Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Alcune specie di *Cryptococcus*, oltre a vari ceppi di *C. neoformans*, capaci di crescere a 37° C, sono state sperimentate su topini, inoculando a varie dosi per via e.v., i.p., i.c., nel tentativo di dimostrarne l'eventuale opportunismo. Le analisi microbiologiche, istologiche, ematocliniche (glucosio, urea, creatinina, GOT, GPT) effettuate sugli animali programmaticamente abbattuti, hanno mostrato una grande variabilità di virulenza tra i ceppi di *C. neoformans* e insignificanti modificazioni con le altre specie. Una seconda serie di esperienze, effettuate cortisonizzando gli animali inoculati con alte dosi, non è stata sufficiente a dimostrare l'opportunismo patogeno dei criptococchi non *neoformans*.

**Summary** ((Experimental Pathogenicity of *Cryptococcus* sp. in Normal and Cortisone-treated Mice). - A number of *Cryptococcus* sp. along with several strains of *C. neoformans* capable to grow at 37° C were examined for their pathogenicity for mouse on administration by several route (i.v., i.p., i.c.). Animals sacrificed at intervals during the experiments were subjected to microbiological, histological and hematoclinical examination. The results showed that strains of *C. neoformans* (but not of other *Cryptococcus* spp.) were endowed with a wide range of pathogenicity potential. Cortisone-treated mice were not shown to be significantly predisposed to infection by non-*neoformans* species of *Cryptococcus*.

Il *C. neoformans* è stato studiato negli ultimi decenni da vari punti di vista. Il suo particolare opportunismo, la sua alta pericolosità una volta penetrato nell'organismo, la sua natura di « gigante nascosto » [1], probabilmente più presente di quello che non si creda e più dannoso di quello che non si sappia, la fondamentale opera di Littman sulle criptococcosi [2] hanno contribuito a moltiplicarne negli ultimi venti anni gli studi epidemiologici, patogenetici, citochimici, tassonomici (è recente la scoperta della sua forma perfetta basidiomicetica *Filobasidiella neoformans* [3]). Sono molte quindi le acquisizioni sul *C. neoformans*, quanto sporadiche, carenti o imprecise sono le conoscenze sulle altre specie del genere. Consultando la bibliografia recente, anche con l'ausilio del sistema MEDLINE, abbiamo rilevato che sul genere *Cryptococcus* esiste discordanza di dati e di notizie (\*); principalmente non è stato possibile ricavare un modello, o dei suggerimenti sicuri, per condurre, per un certo

fine, prove di patogenicità sperimentale. Molto è descritto sulla via di inoculo più usata nel topino, quella intracerebrale, condotta generalmente a fini diagnostici o di determinazione della virulenza, ma spesso non è specificata o la preparazione delle colture per l'inoculo, o il volume di questo o la dose; indicazioni meno precise si ritrovano per gli inoculi endovena e intraperitoneali.

Studi di invasività e sul ruolo opportunistico di altre specie del genere *Cryptococcus* non esistono, anche perché spesso è invalsa la convinzione che tali specie sono incapaci di sviluppare a 37° C [6, 7, 10]. Eppure *C. albidus* (var. *albidus* e var. *diffuens*), *C. laurentii*, *C. luteolus* sono stati saltuariamente isolati in campioni clinici (urine, pelle, tratto respiratorio [11, 12]) e riportati in articoli di interesse medico [13]; noi stessi abbiamo isolato *C. albidus* in organi diversi di feto bovino [14] e ci siamo trovati di fronte al quesito di stabilire l'innocuità di un criptococco utilizzato in un processo industriale che ne prevede lo sfruttamento come biomassa e come produttore di enzimi.

Per tutto quanto detto abbiamo ripreso lo studio di patogenicità sperimentale dei criptococchi nei topini.

### MATERIALI E METODI.

**Microorganismi.** - I ceppi di collezione (CBS, IMAT) e di altra provenienza, isolati e identificati secondo Lodder [15] con osservazioni morfologiche e prove biochimiche e fisiologiche, sono i seguenti: *C. neoformans* (132 CBS specie tipo, 4710 IMAT, 4711 Ciferri, 4712 IMAT, 4713 tampone nasale, 4714 Ciferri); *C. laurentii* (4687 IMAT, 4688 espettorato di paziente tubercolotico, 4821 lievito di pane); *C. albidus* (4709 ceppo industriale); *C. albidus* var. *diffuens* (17ab feto bovino); *C. terreus* (1895 CBS suolo); *C. skinneri* (5029 CBS insetti); *C. dimennae* (5770 CBS mangime); *C. lactivorius* (5771 CBS acqua di mare).

**Terreni di coltura.** - Per l'isolamento è stato utilizzato il terreno differenziale e selettivo BCG (brom cresol green) con aggiunta di penicillina (50 U/ml)

(\*) Sulla patogenicità primaria o sull'opportunismo del *C. neoformans* [4, 5]; sulla barriera dei 37° C come temperatura massima di sviluppo per i non *neoformans* [6-8]; sulla produzione di ureasi [9], ecc.

e streptomycin (50  $\gamma$ /ml); per la conservazione e i passaggi routinari agar-malto; per allestire le colture inoculo brodo nutritivo glucosato (BNG). Per le osservazioni morfologiche sono state allestite *slide cultures* in *corn meal agar* con *tween 80*.

**Preparazione dell'inoculo.** - Colture cresciute 48 h su agar malto a 27° C vengono seminate in beute con BNG e poste in shaker rotatorio a 37° C per 48 h. Dopo conta in camera di Thoma si allestiscono sospensioni diluendo opportunamente le colture con soluzione fisiologica fino alle concentrazioni desiderate.

**Animali.** - Sono stati utilizzati topini maschi ceppo Swiss (Charles River) di 18-20 g. Stabulati a temperatura costante di 21° C  $\pm$  1° C e umidità relativa del 55 %, alimentati *ad libitum* con mangime pellettato della Ditta Piccioni.

**Prove di patogenicità.** - Sono state eseguite inoculando lotti di 10 animali con dosi variabili da 1 a  $50 \times 10^7$  cellule in 0,5 ml per via endovenosa e intraperitoneale e con dosi variabili da 5 a 30 milioni in 0,02-0,03 ml per via intracerebrale. In alcune esperienze gli animali sono stati trattati per via intramuscolare con 0,1 ml (4 mg) di acetato di metil prednisolone (Depomedrol Upjohn) 4 gg prima e 3 gg dopo l'inoculo dei criptococchi. Ad un gruppo di controllo è stato somministrato solo il cortisonico. Gli animali sono stati tenuti in osservazione per tempi variabili da 4 a 8 settimane a seconda delle esperienze. Gli organi (rene, cervello, fegato, polmone e milza) degli animali morti o abbattuti durante il corso delle esperienze sono stati esaminati microbiologicamente mediante piastramento in agar malto e osservando successivamente le colonie cresciute dopo 48 h di incubazione a 27° C con colorazione negativa a fresco.

**Determinazione dei parametri ematici.** - Sono stati eseguiti prelievi di sangue dal plesso retroorbitale degli animali infettati e dei controlli al 2°, 5° e 16° giorno di esperienza e determinati i livelli sierici di glucosio, urea, creatinina, glutammico ossalacetico transaminasi (GOT) e glutammico piruvico transaminasi (GPT)(\*\*).

**Esame istologico.** - È stato eseguito su parte degli organi analizzati microbiologicamente dopo fissazione in formalina salata di Policard, inclusione in paraffina a p.f. 58-60° C, sezione al microtomo Jung di circa 5-6  $\mu$ . e colorando con tecniche diverse: ematossilina-cosina; metodo P.A.S. associato al metodo Van Gieson; colorazione a fluorescenza acridine-orange ed infine col blu di toluidina.

**Risultati e discussione.** - Dopo uno *screening* su numerosi ceppi appartenenti ad una ventina di specie e varietà di criptococchi [16] sono stati sperimentati su topini quelli precedentemente elencati, che hanno evidenziato la capacità di sviluppare a 37° C. Nella Tab. 1 sono riportati i ceppi di *Cryptococcus* che sono risultati positivi agli esami microbiologici effettuati su rene (R), cervello (C), fegato (F), polmone (P) e milza (M) degli animali inoculati. Non vengono riportati *C. albidus* 4709, *C. terreus* 1895, *C. dimennae* 5770, *C. lactativorus* 5771, mai isolati e *C. albidus* var. *diffuens* 17ab raramente ritrovato. Sono riportati i dati relativi ai primi tre abbattimenti effettuati al 7°, 14°, 30° giorno dagli inoculi, mentre per la esigua e saltuaria presenza dei criptococchi negli organi non

sono stati trascritti i risultati del IV abbattimento eseguito intorno al 2° mese di esperienza. Sono state inoculate dosi diverse in rapporto alla specie ed alla via di inoculazione; i vari ceppi di *C. neoformans* (inoculati e.v. ed i.p.) hanno mostrato, anche in relazione al tipo ed alla quantità d'inoculo, un'ampia variazione del grado di virulenza in termini di permanenza negli organi e di mortalità (dal 100 % col 4714 allo 0 % col 4711 - inoculo i.p.  $2 \times 10^8$ ; dall'80 % col 4714 al 10 % col 4712 - inoculo e.v.  $2,5 \times 10^7$ ).

Delle altre specie di *Cryptococcus*, solo *C. laurentii* 4687 e *C. skinneri* 5029 hanno mostrato una presenza limitata ed attenuata nel tempo.

Nella Tab. 2 sono riportati i risultati dell'esame di alcuni parametri ematoclinici dei topini inoculati e.v. ( $5 \times 10^7$ ) con *C. laurentii* 4687, *C. skinneri* 5029, *C. albidus* var. *diffuens* 17ab e con *C. neoformans* 4710 a bassa virulenza (inoculo e.v.  $10^7$  - i.p.  $10^8$ ); con questo ultimo, con i due tipi di inoculo, si sono riscontrati durante l'infezione aumenti considerevoli di urea e creatinina, indici di compromessa funzionalità renale e delle due transaminasi, indici di danno cellulare. Delle altre specie solo con il *C. laurentii* 4687 si sono riscontrati intorno al 5° giorno valori superiori rispetto ai controlli dell'urea e della creatinina. Per una rapida indagine istologica è stato scelto il metodo con blu di toluidina che colora i criptococchi, e in particolar modo la capsula, in rosa (Fig. 1). Un maggior dettaglio della morfologia capsulare si è ottenuto sfruttando il metodo acridine-orange con cui la struttura risulta nitida, con una fluorescenza arancio brillante. Questa metodica permette di evidenziare anche singole blastocellule ben contrastate su fondo nero (Fig. 2). Poiché questi due metodi non consentono di rilevare eventuali reazioni dei tessuti in esame, sono state effettuate la colorazione con ematossilina-cosina, che evidenzia tutti gli elementi di richiamo linfocitario (Fig. 3) e una colorazione che associa una reazione istochimica (P.A.S.) ad una colorazione istologica (Van Gieson), che rileva contemporaneamente sia i lieviti che le alterazioni istopatologiche di tipo degenerativo o reattivo nel tessuto in esame.

In tutti gli organi esaminati degli animali inoculati con *C. neoformans* sono presenti focolai infiammatori diffusi con i macrofagi che ne rappresentano l'elemento dominante; i lieviti, isolati o a gruppi, si presentano con le caratteristiche formazioni a «bolla di sapone», particolarmente evidenti nel cervello, che risulta l'organo più colpito. Nel fegato si osserva una limitata presenza di lieviti, con localizzazione prevalente sotto la glissoniana. Si osservano anche alterazioni a livello delle strutture renali, con prevalenza di fatti degenerativi, in accordo con le alterazioni ematocliniche riscontrate. Solo in alcune specie di criptococchi non *neoformans* si rilevano saltuariamente una blanda presenza di lieviti e scarsi fenomeni reattivi. Con *C. laurentii* si osserva talvolta un leggero richiamo linfocitario nel parenchima renale (Fig. 4).

(\*\*) Glucosio - metodo di Werner (Werner W., Rey H. G. & Wielinger H. 1970. Z. Analit. Chem. 252, 224); urea - test enzimatico colorimetrico (Fawcett J., Scott J. E., J. Clin. Path. 1960, 13, 156); creatinina - metodo colorimetrico al picrato alcalino, Henry R. J. 1968. Clinical Chemistry Principles and Technics-Harper & Row, pag. 300); glutammico ossalacetico e glutammico piruvico transaminasi (G.O.T. e C.P.T.) - metodo colorimetrico di Reitman e Frankel (Reitman S. e Frankel S. 1957. Am. J. Clin. Path., 28, 56).

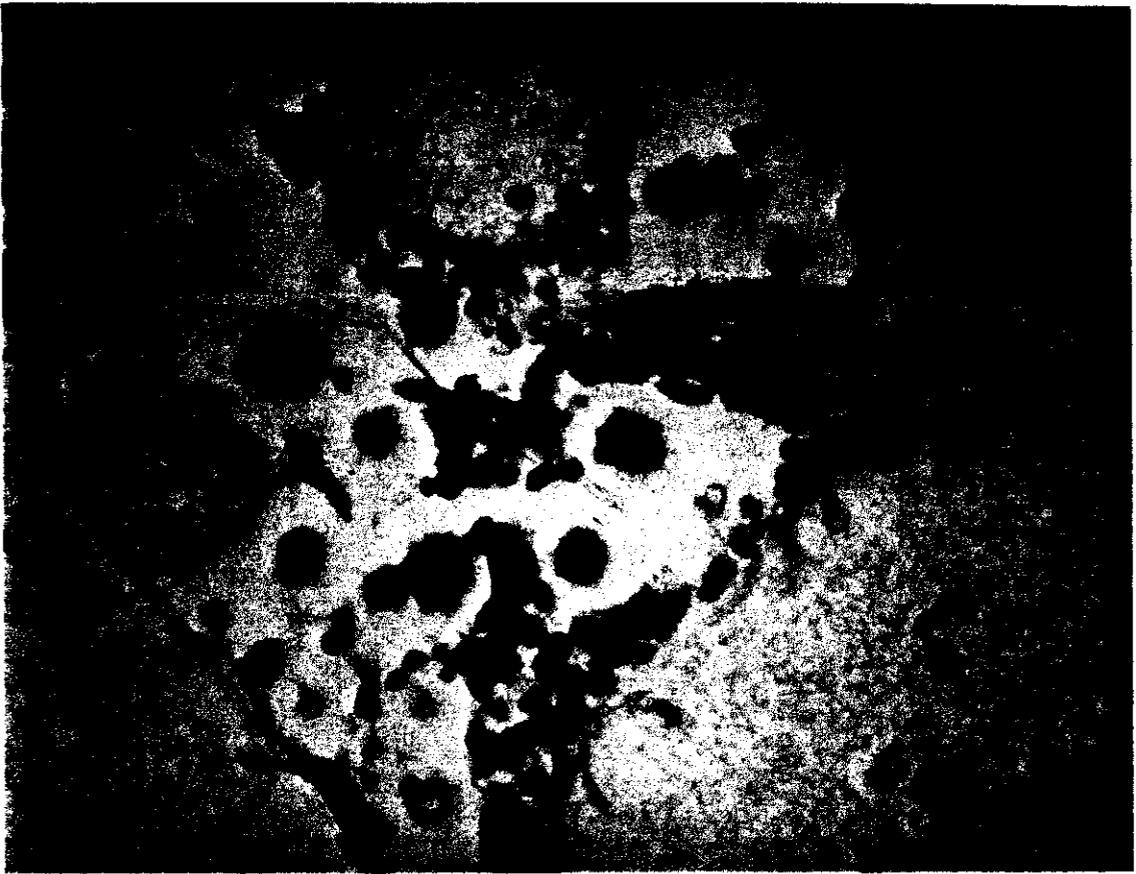


FIG. 1. - *Cervello: Blu di toluidina 250 X. Cellule di C. neofomans disseminate nello spazio subaracnoideo*

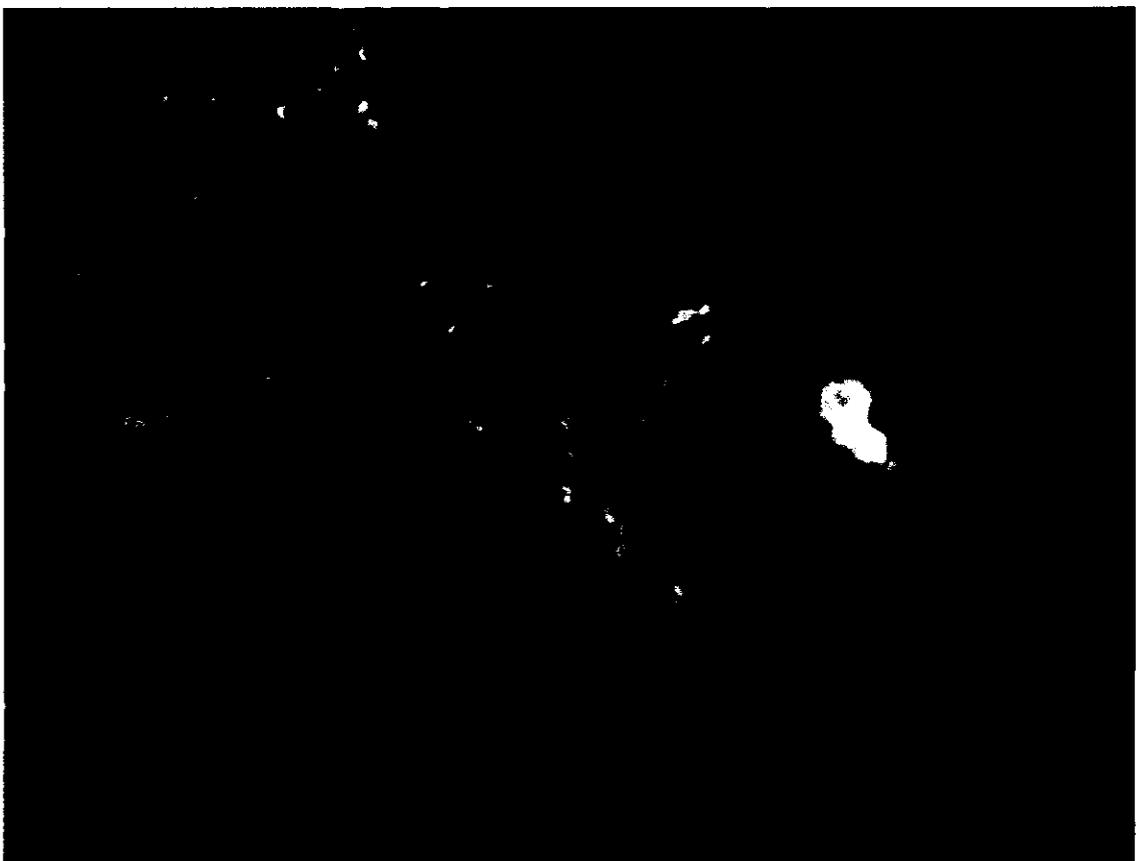


FIG. 2. - *Cervello: Acridine-orange 250 X. Una sola cellula risalta nel contesto del tessuto*

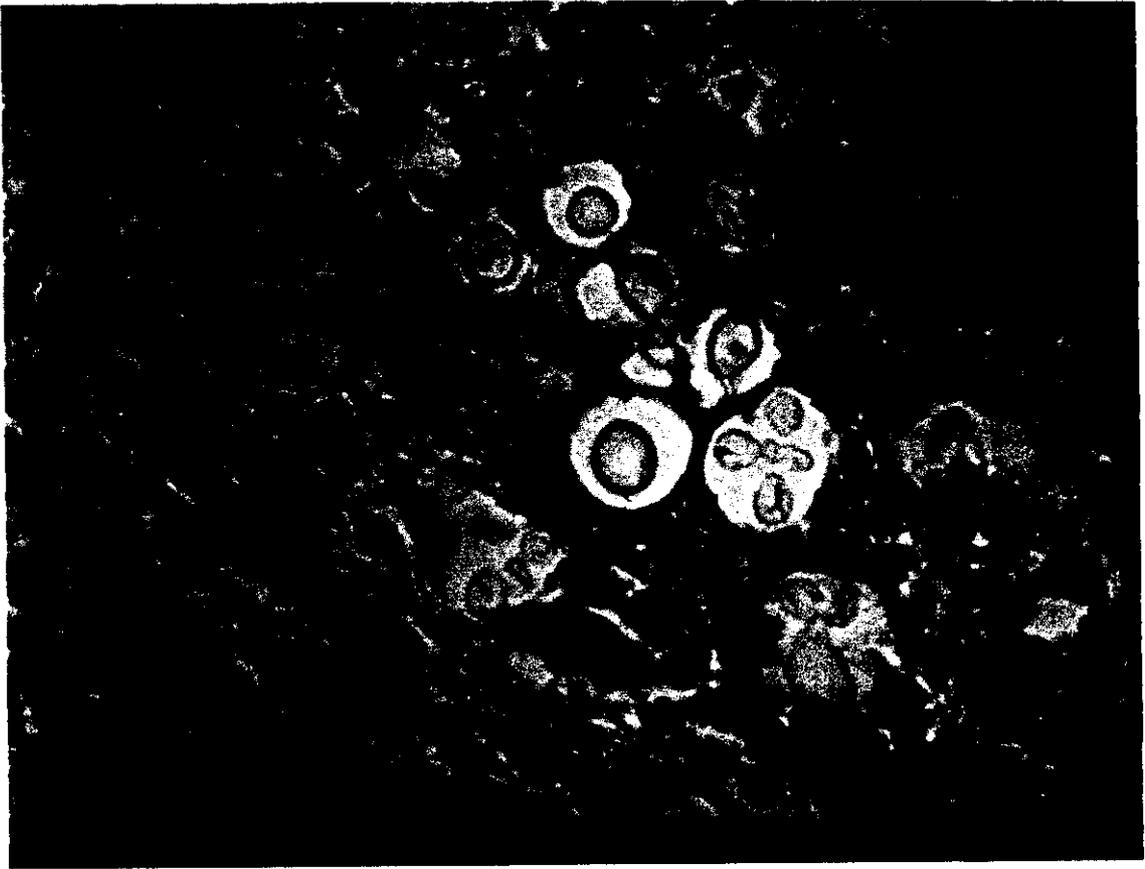


FIG. 3. - *Cervello: Ematossilina-eosina 400 X. Formazioni a «bolla di sapone» in una reazione flogistica*

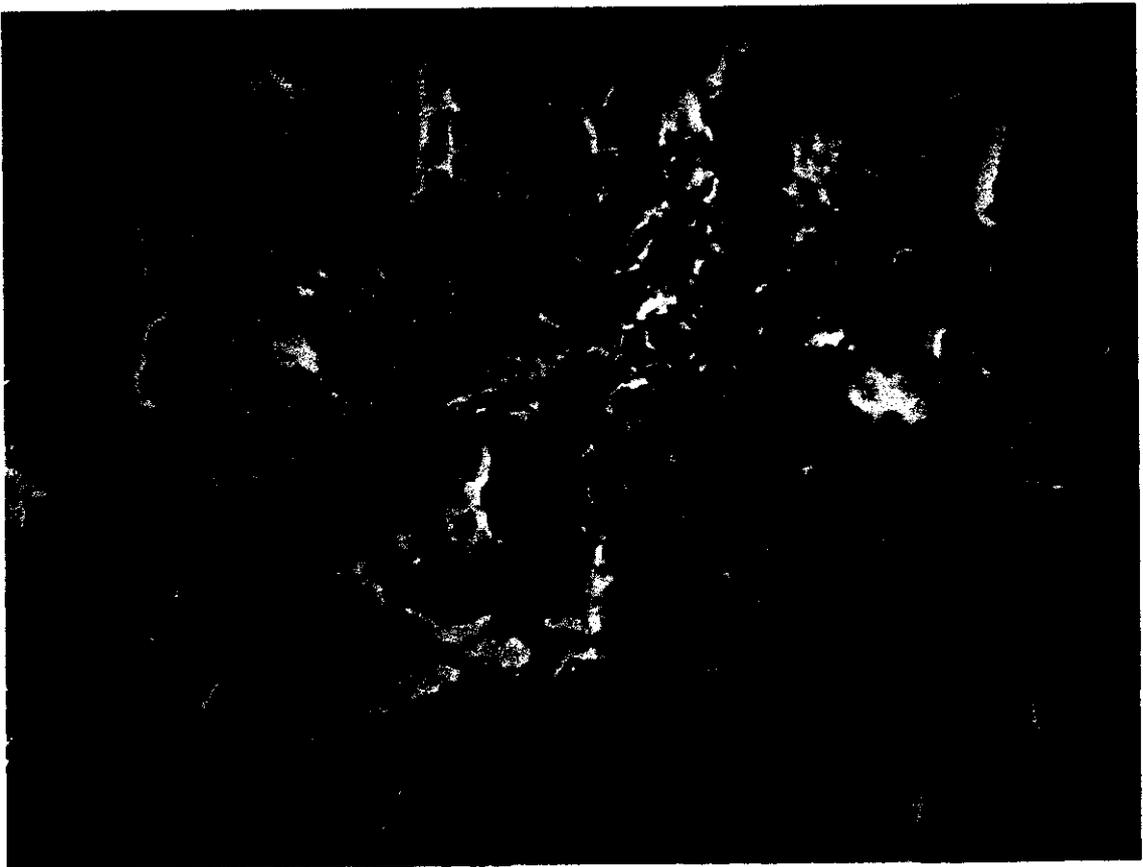


FIG. 4. - *Rene: PAS-Van Gieson 250 X. Leggera reazione tissutale a carico dei tubuli*

Tabella 1. - Presenza dei criptococchi negli organi dei topini inoculati per via endovena ed intraperitoneale con varie dosi.

ENDOVENA										CEPPI	INTRAPERITONBALE																								
III Abb.			II Abb.			I Abb.			N. morti gg. decessi		Dose ×10 <sup>6</sup>	Dose ×10 <sup>6</sup>	N. morti gg. decessi	I Abb.			II Abb.			III Abb.															
R	C	F	P	M	R	C	F	P						M	R	C	F	P	M	R	C	F	P	M	R	C	F	P	M						
					2	1	4	2	2	2	+	2	2	2						10	Cr. neoformans 4710	100	3 7	2	2	4	1	2	4	+	3	+	3		
2	2									4	4	4	3	3	$\frac{1}{11}$	$\frac{1}{13}$	$\frac{1}{33}$	25	Cr. neoformans 4711	200		3	4	4	3	3	4	4	2	2	3	4	2	2	2
										2	1	$\frac{1}{7}$	12,5	Cr. neoformans 4712	100		5	4	5	4	4	4	3	5	3	4	4	4							
					1					2		25	Cr. neoformans 4712	200	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{2}{14}$	5	5	5	5	5	4	4	5	3	4	5	4	4	4	4			
3					4	4	2	2	2	3	4	2	3	3	$\frac{1}{5}$	$\frac{3}{12}$	$\frac{1}{17}$	25	Cr. neoformans 4713	200	$\frac{1}{5}$	4	4	4	2	3	4	4	5	3	3	4	4	2	2
					4	2				3	3	2	$\frac{4}{3}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{1}{12}$	25	Cr. neoformans 4714	200	$\frac{4}{3}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{2}{11}$														
2					4	4	3	3	2	4	4	3	3	$\frac{1}{9}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{27}$	50	Cr. neoformans 132	50	$\frac{1}{2}$	4	4	5	2	4	4					2				
2	2	2			4	2	2	2	2	4	4	5	3	4	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{10}$		25	Cr. neoformans 132	200	$\frac{1}{4}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{32}$	2	3	2	2	4	4	4	2	3	1		
														12,5	Cr. laurentii 4687	100		2	3	3						4	4	2							
					1	1						25	Cr. laurentii 4687	200		3	2	3	3						2	2									
														Cr. skinneri 5029	200		2	2	2	2															
					2	2						50	Cr. skinneri 5029	500		2	2	2	2	1	1														

## Legenda:

R = rene; C = cervello; F = fegato; P = polmone; M = milza.  
 I Abb. = Abbattimento 7<sup>o</sup> giorno  
 II Abb. = Abbattimento 14<sup>o</sup> giorno  
 III Abb. = Abbattimento 30<sup>o</sup> giorno  
 1 = poche colonie  
 2 = 10-25 colonie  
 3 = 50-100 colonie  
 4 = 150-300 colonie  
 5 = patina

Tabella 2. - Valori di alcuni parametri ematici in topini inoculati con varie specie di criptococchi.

PARAMETRI EMATICI	Valori normali	2 <sup>o</sup> giorno						5 <sup>o</sup> giorno						16 <sup>o</sup> giorno					
		4687 E.V.	5029 E.V.	17AB E.V.	4710 E.V.	4710 I.P.	C	4687 E.V.	5029 E.V.	17AB E.V.	4710 E.V.	4710 I.P.	C	4687 E.V.	5029 E.V.	17AB E.V.	4710 E.V.	4710 I.P.	C
Glucosio mg%ml	66-120	117	115	116	113	86	112	104	100	100	85	76	98	78	94	96	117	72	102
Urea mg%ml...	16-30	30	28	29	28	65	23	44	28	26	46	50	28	23	23	28	41	57	27
Creatinina mg/ml	0,4-1	0,6	0,6	0,6	0,63	0,7	0,64	1,39	0,7	0,7	1,7	1,9	0,6	0,9	0,8	0,7	2	2,6	0,7
G.O.T. μU/ml..	95-124	92	90	105	149	187	94	106	94	94	197	215	99	—	—	—	218	212	101
G.P.T. μU/ml...	40-55	39	42	41	41	44	39	46	41	44	70	72	47	—	—	—	65	80	47

4687 Cr. laurentii }  
 5029 Cr. skinneri } → E.V. inoculo endovena (5 × 10<sup>7</sup>)  
 17AB Cr. albidus }  
 4715 Cr. neoformans E.V. (10<sup>7</sup>) I.P. inoculo intraperitoneale (10<sup>8</sup>)

Per evidenziare l'eventuale comportamento opportunistico di *C. skinneri* 5029, *C. terreus* 1895, *C. albidus* var. *diffuens* 17ab, *C. laurentii* 4687, *C. laurentii* 4688 che nelle nostre condizioni sperimentali non avevano dato luogo ad eventi mortali, la cui presenza negli organi era risultata solo saltuaria, si è ricorsi alla cortisonizzazione degli animali seguendo indicazioni scaturite da precedenti esperienze e sulla base delle osservazioni di Mankowski [17] che somministrando estradiolo per via intramuscolare nei topini aveva dimostrato un aumento della virulenza del *C. neoformans*, e di Königsbauer [18] che inoculando cortisone sotto cute in ratti aveva osservato un aumento dell'intensità dell'infezione; anche in alcuni casi clinici riportati in letteratura [19, 20] è stata osservata una progressione dell'infezione criptococcica in pazienti sottoposti a terapia cortisonica. I risultati ottenuti sono invece in contrasto con quanto ipotizzato, poiché sono risultati negativi gli esami microbiologici e istologici effettuati sugli organi degli animali cortisonizzati ed abbattuti al 7°, 14° e 21° giorno di esperienza, in accordo del resto con le osservazioni di Louria [21] e più recentemente di Green [22] che non hanno osservato, in seguito a trattamento cortisonico degli animali, incremento della mortalità e invasività del *C. neoformans*.

#### CONCLUSIONI.

È stata confermata la notevole variabilità patogena in termini di invasività e mortalità dei vari ceppi di *C. neoformans*. Per evitare risposte di difficile interpretazione nel valutare la patogenicità di un ceppo, è necessario inoculare dosi elevate sia per via intracerebrale, utilizzabile a scopi diagnostici, sia per via intraperitoneale e per via endovena, più idonee per studiare il decorso dell'infezione. La determinazione dei parametri ematici risulta di notevole ausilio: con il *C. neoformans* si sono evidenziate alterazioni della funzionalità renale ed epatica in accordo con i riscontri istologici; può inoltre confermare l'innocuità di altre specie.

I risultati insignificanti ottenuti con il trattamento con il cortisonico suggeriscono di condurre ulteriori indagini (particolari linee di topi od altri animali e/o altri trattamenti defedanti) per individuare un modello sperimentale più idoneo allo studio del comportamento delle specie non *neoformans*.

#### Ringraziamenti.

Si ringraziano i signori Vincenzo Adriani, Mario Biancini e Franco Malatesta per la valida assistenza tecnica prestata.

#### BIBLIOGRAFIA

- KAUFMAN, L. & BLUMER, S. 1978. The Black and White Yeasts. In: *Cryptococcosis: the awakening giant*. Sci. Publ. No. 356, Pan American Health Organization, Washington D.C., pp. 176-182.
- LITTMAN, M. L. & ZIMMERMAN, L. E. 1956. *Cryptococcosis*. Grune & Stratton, New York - London.
- KWON-CHUNG, K. J. 1975. Description of a new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. **67**: 1197-1200.
- LA PLACA, M. 1971. *Principi di Microbiologia Medica*. Lib. Univ. Tinarelli.
- CAMPBELL, M. C. & STEWART JOYCE, L. 1980. *The Medical Mycology*. John Wiley & Sons, New York.
- VAN BREUSEGHEM, R., DE VROEY, CH. & TAKASHIO, M. 1978. *Guide pratique de Mycologie Médicale et Veterinaire*. Ed. Masson, Paris.
- CONANT, N. F., SMITH, D. T., BAKER, R. D. & CALLAWAY, J. L. 1971. *Manual of Clinical Mycology*. W.B. Saunders Comp., Philadelphia-London-Toronto.
- BENEKE, E. S. & ROGERS, A. L. 1970. *Medical Mycology Manual*. Burgess Publ. Comp., Minneapolis, Minn.
- KONEMAN, W. E., ROBERTS, G. D. & WRIGHT, S. F. 1979. *Practical Laboratory Mycology*. Williams & Wilkins Comp., Baltimore.
- DROUHET, E. 1979. Elements de diagnostic des mycoses profondes. *Chimioterapia antimicrobica*. **3**: 200-215.
- WALKER, L. J. & LUECKE, M. R. 1974. The identification of yeasts from clinical material. *Proc. Iowa Acad. Sci.* **81**: 1-9.
- AL-DOORY, Y. 1980. *Laboratory Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- AHEARN, D. G. 1976. Identification and Ecology of Yeasts of Medical Importance. In: *Opportunistic Pathogens*. J. E. Prier & H. Friedman (Ed.). University Park Press, Baltimore-London-Tokyo, pp. 129-146.
- DE BERNARDIS, F., CONDOLEO, R., TUTTOBELLO, L., FRATONI, F., VULCANO, G. & ALEANDRI, M. 1981. Isolamento di miceti da feti bovini ed ovini abortiti. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* **35**: 714-715.
- LODDER, J. 1970. *The Yeasts*. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-London.
- TUTTOBELLO, L., DE BERNARDIS, F., MORELLI, L., FRATONI, F. & PALLIOLA, E. 1981. Esperimenti di patogenicità su topini con ceppi diversi di *Cryptococcus*. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* **35**: 697-698.
- MANKOWSKI, Z. T. 1954. The influence of various sex hormones on experimental fungus infections. In: *Antibiotics and Chemotherapy*. **4**: 1100-1104.
- KÖNIGSBAUER, H. 1954. Über die Wirkung von Corton auf die experimentelle Torulose und Chromoblastomykose. *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkd., Infektionskr.* **160**: 637-643.
- LAUZÈ, S. 1952. Infection à torula chez un individu traité aux antibiotiques et à la cortisone. *Union Med. Canada*. **81**: 935-940.
- LINDEN, I. H. & STEFFEN, C. G. 1954. Pulmonary cryptococcosis. *Am. Rev. Tuberc.* **69**: 116-120.
- LOURIA, D. B. & BROWNE, H. G. 1960-61. The effects of cortisone on experimental fungus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **89**: 39-46.
- GREEN, J. R. & BULMER, G. S. 1979. Gastrointestinal inoculation of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Sabouraudia*. **17**: 233-240.

## Induzione della trasformazione ifale, uptake ed incorporazione della N-acetil-D-glucosamina in *Candida albicans*

ELENA MATTIA (a, b), GIUSEPPE CARRUBA (a), LETIZIA ANGIOLELLA (b) e ANTONIO CASSONE (b)

(a) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma;

(b) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - È stata studiata la risposta germinativa di vari ceppi di *Candida albicans*. Essi sono stati divisi in high e low-responders a seconda della capacità di subire la trasformazione ifale in presenza di semplici induttori metabolici (quale la N-acetil-D-glucosamina) (high) o solo in presenza di siero (low). I sistemi di uptake di GlcNAc (inducibile o costitutivo) erano comparabilmente attivi in tutti i ceppi e non correlavano, quindi, con la risposta germinativa. Tuttavia, i ceppi ad alta risposta erano capaci di utilizzare l'induttore precocemente per le sintesi polisaccaridiche parietali.

**Summary** (Uptake and Incorporation of N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*). - The germinative responsiveness of various isolates of *Candida albicans* was studied. Strains could be divided in high and low-responders based on their ability to form germ-tubes in the presence of simple compounds like N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) (high) or only serum (low). Despite minor quantitative differences, the uptake systems (inducible and constitutive) for GlcNAc were comparably active in all strains. However, only high responders strains were capable to direct most of the incorporated precursor to wall synthesis rather than use it for general cellular metabolism.

### INTRODUZIONE.

*Candida albicans* è un patogeno dimorfo, capace cioè di crescere sia in forma lievito sia in forma miceliare. Quest'ultima riveste particolare importanza nell'invasività di questo microrganismo fungino, intesa essenzialmente come capacità di opporsi ai meccanismi difensivi naturali dell'ospite [1]. Pertanto, gli studi sul dimorfismo di *C. albicans* rivestono un duplice, rilevante interesse:

1) la comprensione di fondamentali meccanismi morfogenetici;

2) il chiarimento di problemi legati alla patogenicità e alla virulenza. Uno dei più semplici ed efficaci induttori della transizione lievito-micelio, è la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) [2] ed è stato ipotizzato che questo composto agisca come specifico attivatore della sintesi di chitina, un polisaccaride che aumenta notevolmente durante la formazione del tubo germinativo e nella parete cellulare dell'ifa matura [3].

Bisogna considerare, però, che *C. albicans*, come pure altri lieviti, può utilizzare GlcNAc come fonte di carbonio per la crescita anche sottoforma lievito o pseudomiceliare [4]. Quindi il problema cruciale è quello di capire quale via metabolica della GlcNAc sia specifica della trasformazione ifale. In questa linea sono stati condotti esperimenti per valutare:

a) la possibilità che diversi ceppi di *C. albicans* rispondessero in maniera differenziale alla GlcNAc, come pure ad altri semplici induttori della trasformazione ifale;

b) i meccanismi di uptake della GlcNAc in ceppi con diversa risposta germinativa;

c) l'incorporazione di GlcNAc in diverse frazioni cellulari durante la trasformazione ifale.

### MATERIALI E METODI.

**Organismo e condizioni di crescita.** - Sono stati utilizzati ceppi di *C. albicans* con differenti capacità germinative. I ceppi BP e A72 sono stati isolati da campioni clinici mentre i ceppi CA2, M1, M3 sono stati ottenuti come varianti resistenti all'echinocandina [5]. Tutti sono stati identificati con gli usuali criteri tassonomici, e mantenuti in forma lievito a 28°C su terreno solido di Winge (0,2% glucosio e 0,3% estratto di lievito; x/v).

**Formazione del tubo germinativo.** - Blastospore dei diversi ceppi cresciute su terreno di Winge liquido erano raccolte in fase stazionaria, lavate e risospese ad una densità finale di  $1-2 \cdot 10^6$  cellule/ml in mezzo base salino contenente ( $\text{grl}^{-1}$ )  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2; NaCl; 5; più uno dei seguenti induttori:

1) siero di cavallo (SIAL, Roma, Italia) 10% (v/v);

2) GlcNAc (4 mM) o prolina (50 mM);

3) Glucosio + Glutamina (ambidue 2,5 mM).

La formazione del tubo germinativo e lo sviluppo ifale erano valutati per un periodo di 12 ore dopo incubazione a 37°C.

**Uptake di GlcNAc.** - Cellule lievito dei diversi ceppi, in fase stazionaria di crescita erano lavate e risospese ad una concentrazione finale di  $10^6$  cellule/ml<sup>-1</sup> in

mezzo base salino ed pre-incubate a 28° C o a 37° C per 3 ore con o senza GlcNAc (5 grl<sup>-1</sup>).

Le cellule erano quindi lavate e risospese in mezzo base contenente <sup>3</sup>HGlcNAc (Attività specifica: 11Ci mmoll<sup>-1</sup>) in un volume finale di 0,2 ml. A diversi intervalli di tempo l'incorporazione di GlcNAc era bloccata aggiungendo 5 ml di mezzo base freddo contenente GlcNAc 22 mM e la radioattività incorporata nel totale cellulare era misurata. Per valutare l'uptake di GlcNAc durante la formazione del tubo germinativo, cellule del ceppo BP erano indotte da GlcNAc (4 mM) o da prolina (50 mM), a 37° C, in un volume totale di 50 ml (10<sup>6</sup> cell ml<sup>-1</sup>). A intervalli durante la germinazione, colture in doppio erano centrifugate e le cellule risospese in un mezzo base (densità finale: 5 · 10<sup>7</sup> cellule ml<sup>-1</sup>). Esse erano quindi incubate a 37° C per 2 minuti in presenza di 10 µCi di [<sup>3</sup>H] GlcNAc. L'incorporazione era bloccata e la radioattività misurata come precedentemente descritto. È stata anche valutata l'incorporazione di [<sup>3</sup>H] GlcNAc in singole frazioni cellulari del ceppo BP di *C. albicans* indotto a formare tubi germinativi a 37° C oppure in crescita lieviforme a 28° C. A tale scopo erano preparate le frazioni cellulari acido ed alcali-acido insolubile secondo quanto descritto altrove [6].

I pesi secchi di queste frazioni come pure del totale cellulare erano misurati secondo quanto riportato precedentemente. Le proteine erano determinate secondo il metodo di Lowry [7].

**Determinazione della radioattività.** - I materiali cellulari radioattivi erano raccolti su filtri Millipore 0,45 µ, preessiccati in stufa prima di essere dissolti in soluzione di Bray [8]. I materiali erano letti allo scintillatore in fase liquida Beckman LS 81100. L'efficienza di conteggio era calcolata mediante il rapporto dei due canali usando il metodo dello standard esterno.

## RISULTATI.

**Germinabilità dei vari ceppi di *C. albicans* in differenti mezzi induttivi.** - Nelle prove intese a caratterizzare la capacità di risposta germinativa all'induzione da GlcNAc, in paragone ad altri induttori, diversi ceppi di *C. albicans* sono stati saggiati in terreni contenenti GlcNAc, o siero, o prolina o glucosio + glutamina. Come risulta dalla Tab. 1, i diversi ceppi di *C. albicans* differiscono largamente nella loro risposta agli induttori germinativi. Alcuni, tipo il BP e l'A72 (definiti *high responders*) sono in grado di germinare estesamente in presenza di semplici metaboliti quali la GlcNAc o la prolina o il glucosio + glutamina. Altri, quali M1 ed M3 (*low-responders*), germinano solo in presenza di terreni complessi come il siero. Infine il ceppo CA2 (*non responder*) risulta refrattario a qualsiasi induttore.

Come precedentemente osservato [4], cellule del ceppo BP in fase esponenziale o in fase stazionaria di crescita in presenza di GlcNAc o prolina sono in grado di dar luogo entro poche ore ad una massiccia formazione di tubi germinativi che evolvono successivamente in ife mature con micelio sommerso. Tutti i ceppi *high responders* si comportano in maniera sostanzialmente uguale al ceppo BP sia nella cinetica che nell'entità di germinazione. I ceppi *low-responders*, in presenza di GlcNAc o di prolina, a 37° C danno luogo ad una crescita in forma pseudomiceliale.

Tabella 1. - Germinabilità di ceppi di *Candida albicans* in presenza di vari induttori (a).

CEPPO	Tempo di germinazione (ore)	Formazione (%) di tubi germinativi in			
		GlcNAc	Pro	Glc+Glut	Siero
BP .....	2	80	70	60	80
	4	90	90	90	90
	12	M+	M+	M+	M+
A72 .....	4	9	70-80	50-60	90
	12	M+	M±	M-	M+
M1 .....	4	0	0	0	30
	12	PM	PM	PM	50
CA2 ....	4	0	0	0	0
	12	0;PM	0;PM	0;PM	0;PM

(a) Per le condizioni sperimentali adoperate, vedi « Materiali e Metodi ».

Abbreviazioni: GlcNAc = N-acetil-D-glucosamina; Pro = Prolina; Glc+Glut = Glutamina (2,5 mM ognuno); M+ = formazione di micelio sommerso; PM = pseudo-micelio (morfologia mista).

**Uptake di GlcNAc in *C. albicans*.** - Nello studio della correlazione fra capacità germinativa e vie metaboliche di utilizzazione della GlcNAc abbiamo posto primariamente l'attenzione sui meccanismi di uptake di questo zucchero nei diversi ceppi e in condizioni che permettono o meno la formazione del tubo germinativo, cioè a 37° C e a 28° C. Come precedentemente riportato [9], la GlcNAc viene assunta dalle cellule con due sistemi di uptake, uno inducibile, ad alta affinità per il substrato, e uno costitutivo. Tutti i ceppi da noi esaminati possiedono questi due sistemi di uptake, indipendentemente dalla loro capacità di germinare. La Fig. 1 mostra che le curve di uptake nei sistemi inducibili presentano solo piccole differenze di velocità nei tempi iniziali (2-5 minuti) mentre i sistemi costitutivi mostrano più marcate divergenze nell'uptake totale a 15 e 30 min. È interessante notare che l'uptake costitutivo nei ceppi *high responders* è più basso rispetto all'analogo sistema degli altri ceppi. I valori dei Km e delle Vmax calcolate per i due sistemi sono risultati pressoché identici a quelli riportati precedentemente da altri autori [9]. I sistemi di uptake della GlcNAc sono stati esaminati anche durante la trasformazione ifale, a tempi corrispondenti sia allo sviluppo iniziale (tubo germinativo) che terminale dell'ifa. Per studiare l'uptake costitutivo della GlcNAc, le cellule sono state indotte a germinare dalla prolina. La Tab. 2 mostra che l'uptake di GlcNAc (sia indotto che costitutivo) diminuisce regolarmente durante la trasformazione ifale, specialmente quando esso è calcolato rispetto al peso secco cellulare.

**Incorporazione di [<sup>3</sup>H] GlcNAc in frazioni cellulari di *C. albicans*.** - È stata anche seguita l'incorporazione di GlcNAc marcata in frazioni cellulari rappresentative dei polisaccaridi parietali di *C. albicans*, in condizioni di competenza o non competenza a germinare. I dati della Tab. 3 mostrano chiaramente che la GlcNAc, in condizioni germinative, è rapidamente ed estesamente incorporata in materiale acido-insolubile (pa-

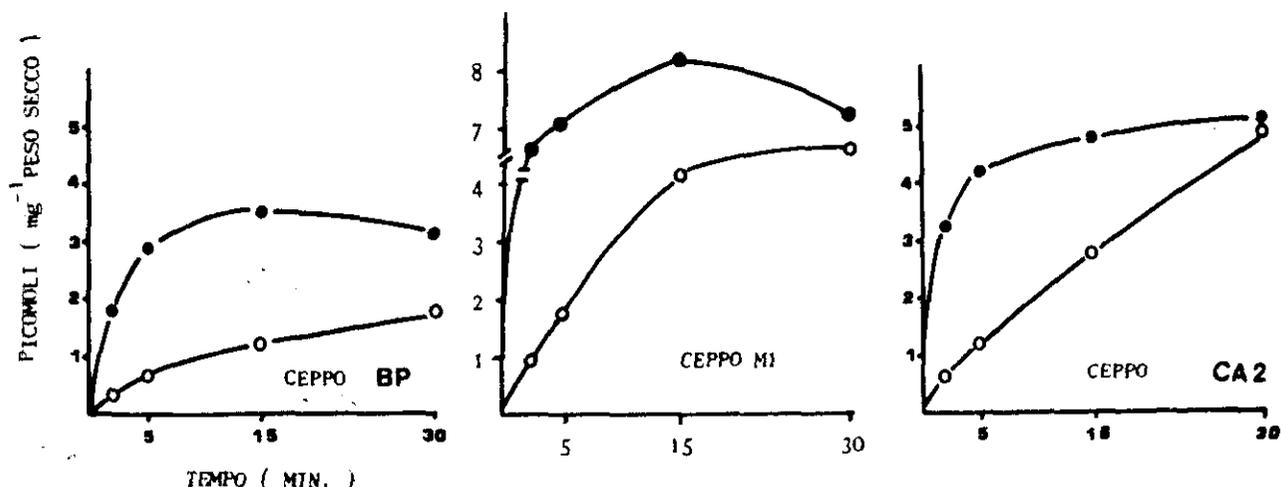


FIG. 1. - Curve di uptake nel totale cellulare da parte dei sistemi ●—●: inducibile e ○—○: costitutivo della GlcNAc in ceppi diversi di *C. albicans*. È stata usata [<sup>3</sup>H]-GlcNAc (11Cimmol<sup>-1</sup>) in dose 10 $\mu$ Ciml<sup>-1</sup>. Per gli altri dettagli sperimentali, vedi testo

Tabella 2. - Uptake iniziale di GlcNAc a differenti tempi durante la formazione di tubi germinativi e la trasformazione ifale in GlcNAc (sistema indotto) o prolina (sistema costitutivo).

TEMPO (ore)	Uptake iniziale (pmolmin <sup>-1</sup> durante la germinazione in			
	GlcNA (mg <sup>-1</sup> peso secco)	(mg <sup>-1</sup> proteine)	Pro (mg <sup>-1</sup> peso secco)	(mg <sup>-1</sup> proteine)
0.....	0,90	2,65	—	—
2.....	8,74	27,30	0,130	0,45
4.....	4,73	26,30	0,100	0,55
8.....	2,6-2,80	18,00	0,035	0,40

È stata usata H-GlcNAc (11 Cimmoli<sup>-1</sup>) in dose 10  $\mu$ Ciml<sup>-1</sup>.

Tabella 3. - Incorporazione di GlcNAc in frazioni cellulari di *C. albicans*, ceppo BP, durante i primi tempi della formazione del tubo germinativo in GlcNAc o Prolina.

TEMPO (min)	Incorporazione nel totale cellulare (pmolmg <sup>-1</sup> peso secco)		% incorporato in		
	GlcNAc	Pro	acido insolubile		alcali acido solubile GlcNAc
			GlcNAc	Pro	
5.....	16,1	5,9	22,0	52,8	12,5
15.....	22,7	—	25,0	—	10,5
30.....	21,7	14,7	52,0	84,8	30,4
60.....	—	26,4	—	98,0	—

È stata adoperata una dose di 50 $\mu$  Ciml<sup>-1</sup> di <sup>3</sup>HGlcNAc (2,94 Cimmole<sup>-1</sup>).

rietaie). Tale incorporazione raggiunge quasi il 100% del totale incorporato quando l'induttore germinativo è la prolina. Larga parte della radioattività acido-insolubile si ritrova a 30-60 min nel componente parietale alcali-acido insolubile, cioè nel ghost glucanochitina [6]. Esperimenti condotti in condizioni non germinative (ceppi low o non-responders oppure ceppi high-responders a 25° C) hanno dimostrato una diversa cinetica di distribuzione della radioattività incorporata

tra totale cellulare e frazioni acido e alcali-acido-insolubile. In particolare, non c'è incremento precoce (15-30 min) dell'incorporazione acido-insolubile.

#### DISCUSSIONE.

I dati riportati in questo lavoro mostrano che i ceppi di *Candida albicans* differiscono significativamente nella induzione della risposta germinativa. Relativamente pochi tra essi (*high responders*) germinano prontamente ed estesamente in presenza di semplici induttori quali la prolina e la GlcNAc. L'evidenza sperimentale ottenuta è, in generale, in accordo con l'ipotesi di uno stretto controllo genetico della *responsiveness*. Alternativamente, è possibile che la risposta germinativa dipenda dal raggiungimento, nel corso del ciclo cellulare, di un set di proprietà biochimiche e strutturali favorevoli (*competenza*). Pertanto, i ceppi differirebbero soltanto nel tempo e/o nelle condizioni in cui la competenza viene raggiunta. In favore di uno stringente controllo genetico della trasformazione ifale parla la esistenza di varianti agerminative di *C. albicans*, riportate saltuariamente in letteratura, e di cui un esempio (la variante CA2 resistente all'echinocandin) è stato descritto in questo lavoro. Mentre non sono note le ragioni della diversa risposta germinativa dei vari ceppi alla GlcNAc, i nostri dati escludono che questo possa dipendere da un selettivo e/o differenziale uptake alla GlcNAc. Infatti, tutti i ceppi incluso il CA2 (*non-responder*) crescono bene su GlcNAc come unica fonte di C/energia e sono in grado di assumere GlcNAc con sistemi inducibile e costitutivo e con comparabile efficienza. La GlcNAc-chinasi non sembra quindi un enzima regolativo dell'induzione germinativa, a conferma di quanto riportato da Shepherd e Coll. [10]. In realtà, nel meccanismo dell'induzione da GlcNAc sembra più importante la capacità del ceppo di utilizzare questo composto per le sintesi parietali più che come fonte energetico/metabolica generale. Infatti durante la trasformazione ifale c'è un disaccoppiamento tra sintesi polisaccaridica e sintesi proteica ed i ceppi ad alta risposta germinativa sono caratterizzati dalla capacità di incorporare rapidamente ed estesamente la GlcNAc nel materiale polisaccaridico parietale.

## BIBLIOGRAFIA

1. ODDS, F. C. 1979. *Candida and Candidosis*. Leicester University Press, Leicester, U.K.
2. SIMONETTI, N., STRIPPOLI, V. & CASSONE, A. 1974. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*. **250**: 344-346.
3. CHATTAWAY, F. W., HOLMES, M. R. & BARLOW, A. J. E. 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **51**: 367-376.
4. MATTIA, E. & CASSONE, A. 1979. Inducibility of germ-tube formation in *Candida albicans* at different phases of yeast growth. *J. Gen. Microbiol.* **113**: 439-442.
5. CASSONE, A., KERRIDGE, D. & MASON, R. E. 1981. Lysis of growing yeast-form cells of *Candida albicans* by echinocandin: a cytological study. *Sabouraudia*. **19**: 97-110.
6. CASSONE, A., MATTIA, E. & BOLDRINI, L. 1978. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by Concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and ultrastructure of the cell wall. *J. Gen. Microbiol.* **105**: 263-273.
7. LOWRY, O. N., ROSEBROUGH, N. S., FARR, A. L. & RANDAL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-272.
8. BRAY, G. A. 1960. A simple, efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* **1**: 279-285.
9. BISWAS, M., SINGH, B. & DATTA, A. 1979. Induction of N-acetyl mannosamine catabolic pathway in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*. **585**: 535-542.
10. CHEW, V. Y., SHEPHERD, M. G. & SULLIVAN, P. A. 1980. Regulation of chitin synthesis during germ-tube formation in *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **125**: 97-104.

### III Sessione: *Immunologia*

#### Relazioni

## Immunoadiuvanti antitumorali di origine microbica: limiti nel sistema e nella struttura

ANTONIO CASSONE

Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - *Varie strutture microbiche, in particolari componenti parietali, sono forti attivatori del sistema immunitario, e ciò ne riflette il potere adiuvante contro i tumori sperimentali e clinici. La complessità dei componenti cellulari e umorali che partecipano alla risposta immune antitumorale e l'altrettanto notevole complessità delle strutture microbiche adiuvanti, impedisce di stabilire modelli d'azione e di predire in qualche modo i risultati. In ogni caso, i componenti parietali microbici sono promettenti strutture in grado di modulare la risposta antitumorale a vantaggio dell'ospite, mantenendo un bassissimo grado di tossicità.*

**Summary** (Antitumor Immuno-Adjuvants of Microbial Origin: Limitations Due to their Structure and to their Action). - *Microbial structures, mostly cell wall components, are in general strong activators of the immune system and this reflects their «adjuvanticity» in the immune surveillance against neoplasia. The complexity of the participants, i.e. microbial structures and immune effectors, makes the overall result of the confrontation somewhat unpredictable, at the moment. The use of simple, purified components from bacterial or yeast cell wall represents a very promising approach toward the ultimate goal which consists in obtaining a feasible compound(s) endowed with strong therapeutic effectiveness (possibly by acting through a definite immunological mechanism) yet maintaining as much the lowest degree of toxicity as possible.*

C'è ormai un'ampia e divulgata conoscenza che la risposta immune protettiva antitumorale può essere attivamente ed aspecificamente potenziata da un impiego corretto di un microrganismo o di un suo prodotto. Esistono cioè gli immunostimolanti antitumorali d'origine microbica. Ben noti esempi di tali immunostimolanti sono il BCG ed il *Corynebacterium parvum*, ma la lista di tali agenti si allunga sempre più, includendo funghi e batteri che, almeno in qualche particolare condizione sperimentale, hanno mostrato di conferire una certa protezione contro i tumori. Un elenco appena esemplificativo è mostrato in Tab. 1, in cui sono rappresentati tutti i grandi gruppi batterici ed i lieviti. Tale diffusa e peculiare attività adiuvante

Tabella 1. - *Immunostimolanti di origine microbica: una lista appena esemplificativa.*

---

BCG, altri Micobatteri
<i>Corynebacterium parvum</i> ed altri corinebatteri
Nocardie e pareti di queste
Listeria
Enterobatteri
Neisserie
Cocchi Piogeni (in particolare Streptococchi)
Brucelle
Klebsielle
Bacillaceae
Micrococchi
Lattobacilli
Saccharomyces
Candida
Altri lieviti e loro prodotti (glucani)

---

antitumorale da parte di strutture microbiche va certamente inquadrata nella constatazione che i microrganismi sono i più forti e persistenti regolatori esogeni del sistema immunitario. L'ospite superiore ha avuto una lunga e continua evoluzione con i microrganismi, adattandosi a difendersi da essi ed è probabile che questo adattamento ha portato l'equilibrio della risposta immunitaria in senso favorevole all'ospite, oltre che nella difesa specifica contro gli stessi microrganismi, anche contro altre minacce alla sopravvivenza, quali certamente sono i tumori. L'evoluzione del sistema immunitario dei vertebrati, l'attacco microbico e la neoplasia progressiva sono immaginabili come eventi evolutivamente in qualche modo inter-

(3) Questo lavoro è dedicato al Prof. Aldo Cimmino, nel giorno del suo commiato da Preside della Facoltà di Medicina di Roma, ed ai Professori Francesco Pocchiari (Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità) e Francesco Filadoro (titolare della II Cattedra di Microbiologia, Università di Roma) che con il loro impegno ed entusiasmo hanno reso possibile la realizzazione del «Convegno Interdisciplinare di Microbiologia Medica».

connessi [1]. È una caratteristica di tutti gli agenti immunomodificatori, una caratteristica che diventa più spiccata per gli immunostimolanti microbici, una curva dose-risposta di tipo « trapezoidale » (dosi efficaci - alte dosi meno efficaci o addirittura dannose [2]). Un immunostimolante microbico può avere perciò effetti negativi (enhancement del tumore, ad esempio) quando venga usato in eccessiva quantità o con protocolli errati di trattamento in rapporto al challenge tumorale. Di qui l'esperienza comune, sia sperimentale che clinica, di una qualche imprevedibilità dell'uso degli adiuvanti microbici. Anche se non è possibile individuare tutti i punti e le ragioni di questa imprevedibilità, una certamente è fondamentale ed è la complessità dei rapporti tra i contendenti (cioè il tumore, il sistema immune ed il microrganismo) che si vengono ad instaurare. In Fig. 1 è schematizzata artigianalmente e senza particolari pretese di precisione la situazione del confronto. È una partita a più giocatori, tutti assai complessi. In particolare, è complesso il sistema immune con i suoi vari effettori umorali e cellulari, con la sua rete di meccanismi di interazioni positive e negative, di vari feedbacks, per cui l'effetto finale sarà una sommatoria algebrica di diverse e, in teoria, anche opposte attività immunologiche, perciò anche fortemente imprevedibile all'atto sperimentale. La vera natura e la distinta partecipa-

zione dei vari effettori immunologici alla stimolazione da parte dell'immunoadiuvante microbico, non sono note, una situazione che rispecchia fedelmente l'incertezza sui meccanismi immunologici che « controllano » la crescita neoplastica.

Negli ultimi anni l'enfasi è stata posta su due maggiori tipi cellulari dell'immunità cosiddetta naturale e cioè il macrofago attivato ed il linfocita *natural killer*, entrambi apparentemente mediati dal sistema interferonico [3]. In realtà, il tentativo di attribuire l'attività antitumorale degli adiuvanti microbici quasi totalmente a stimolazione di questi due effettori sembra una grossolana sopraesemplificazione. In molti modelli sperimentali la mediazione da parte del sistema T-dipendente costituisce un fattore decisivo nell'azione adjuvante, come dimostrato con *Candida* [4].

Da microbiologo vorrei, però, puntare l'attenzione sull'aspetto microbiologico della complessità e tentare di portarla in termini più semplici. L'identificazione dei componenti attivi degli adiuvanti microbici, le loro modifiche mirate e lo sviluppo di analoghi sintetici sono i più importanti obiettivi in questo settore. In particolare, essi possono portare alla preparazione di composti chimicamente capaci di mantenere gli effetti terapeutici ed essere meno tossici dei costituenti macromolecolari di partenza. Tuttavia, le possibilità ed i limiti attuali di questa strategia sono venuti chiaramente a galla nei due esempi che vado ad illustrare scelti fra numerosi altri. Il primo è quello del *BCG-muramyl dipeptide*, scelto per la sua importanza, per così dire, « storica »; l'altro, quello di « *Candida*-glucano » scelto perché è un esempio su cui noi stessi abbiamo lavorato.

Sin dalle prime dimostrazioni dell'efficacia immunoadjuvante antitumorale del BCG in modelli sperimentali, alcuni ricercatori tentarono di identificare i componenti attivi del microrganismo, e fu subito evidente che responsabili degli effetti adjuvanti antitumorali erano sostanze contenute nella parete cellulare del micobatterio. La parete cellulare dei micobatteri è struttura assai complessa, più di una ordinaria parete gram-positiva ed è schematicamente riportata in Tab. 2.

Si tratta di un complesso glico-peptido-lipidico. In particolare si distinguono due stratificazioni: una orizzontale interna che altro non è che il classico *pepti-*

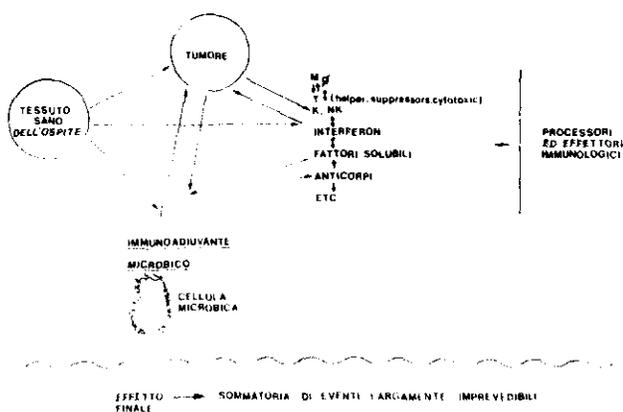
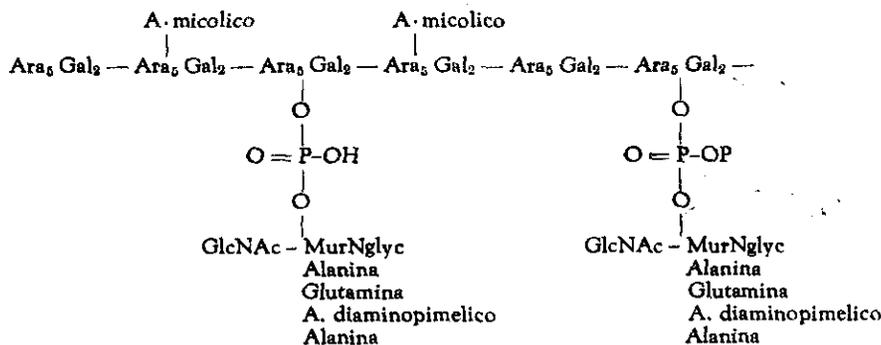


FIG. 1. - Rapporti vicendevoli tumore-ospite, con mediazione del sistema immune e stimolazione da adjuvante microbico

Tabella 2. - Schema esemplificativo della struttura parietale del BCG.



In questo schema (mutuato da Chedid [5]) l'intera struttura costituisce la cera D, un frammento verticale costituito da Ara<sub>5</sub> Gal<sub>2</sub> e peptide legati da un fosfato è l'adiuvante idrosolubile WSA ed il frammento MurNglyc-L-alanina e D-glutamina è il muramyl dipeptide. Ara<sub>5</sub> = arabinosio; Odl = galattosio; GlcNAc = N-acetil-D-glucosamina; MurNglyc = N-acetil muramile

doglicano, l'asse parietale portante di ogni parete batterica, e di un'altra stratificazione esterna costituita da un polimero di *arabino-galactano* con catene laterali periodiche esterne di acido micolico, un peculiare acido grasso a lunga catena,  $\alpha$ -idrossilato,  $\beta$ -insaturo. Punto di contatto tra le due stratificazioni è un radicale fosforico che lega un muramile di una catena interna ad un arabinoso della catena esterna. Questa interessante struttura è assolutamente unica della parete dei micobatteri. «Verticalmente», invece, dalla parete possiamo isolare, attaccandola con enzimi e solventi, tre strutture di fondamentale interesse immunologico. Una è la cosiddetta *cera D* che contiene un frammento di tutti i componenti prima descritti, l'altra è una parte idrosolubile della cera costituita dal dimero fosforilato di arabinogalactano (WSA) ed, infine, la più semplice struttura finora identificata ad azione adiuvante e cioè il *muramyl dipeptide*, costituita cioè da N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamina (MDP). Questo muramyl-dipeptide è stato anche sintetizzato e si son potuti preparare vari analoghi più o meno complessi. La possibilità di comparare strutture man mano più semplici per i loro effetti immunologici è diventata così possibile e numerosi lavori sono recentemente apparsi le cui conclusioni per il momento suggeriscono due fondamentali possibilità:

1) anche la più semplice struttura e cioè il muramyl-dipeptide ha un range diversificato di effetti immunologici: favorisce ad es. l'induzione di DTH agli azobenzenarsonati e la risposta anticorpale ad antigeni proteici sotto forma di varie risposte umorali. Una semplificazione eccessiva fa perdere le risposte cellulo-mediate che invece danno sia la parete cellulare intera, che la *cera D* ed, in parte, il WSA. In particolare si perde il potenziale adiuvante antitumorale. Questo però può essere riguadagnato, almeno per alcuni modelli tumorali, complicando un pochino la struttura dell'MDP, aggiungendo ad esempio un radicale micolico o quinolinico (come dimostrato dal gruppo di Azuma in Giappone) [6]. In entrambi i casi, sembra che una certa complicazione molecolare, ed in parti-

colare la lipofilità della molecola ottenuta attaccando acido micolico o derivati grassi dell'ubochinone sia importante nell'attivare la branca della risposta immune in senso anti-tumorale.

Sia pure con le dovute ed importanti differenze, a conclusioni in qualche modo simili siamo noi stessi arrivati nello studio degli effetti adiuvanti antitumorali dei lieviti, in particolare di *C. albicans*. Anche questo microorganismo ha una parete cellulare ed una struttura parietale complessa, sia pure con componenti chimici assai diversi (Fig. 2). L'area parietale più interna è rappresentata da una matrice fibrosa costituita essenzialmente da  $\beta$ -glucano, la cosiddetta cellulosa dei lieviti, un polimero altamente insolubile di poli- $\beta$  1,3-1,6 D-glucosio, associata con proteine ad una parte esterna costituita da mannano, un polimero del mannosio, anche esso complessato con proteine tramite la N-acetil-glucosamina, la serina e la treonina. Esistono, inoltre, vari tipi di glucani solubili in ambiente acido/alcalino e di diversa conformazione molecolare, in particolare a diversa ramificazione e rapporti di legami  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6, la cui localizzazione nella parete non è stata ben documentata [7].

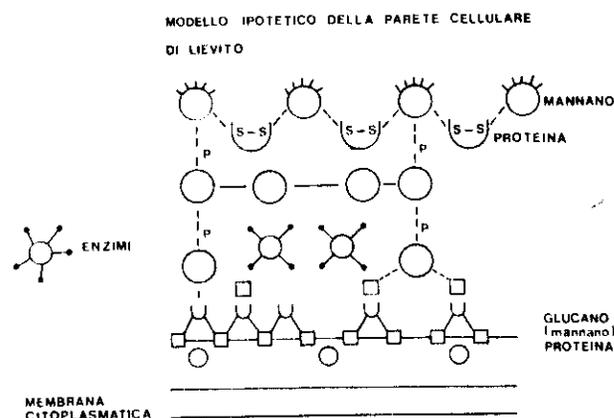


FIG. 2. - Struttura schematica della parete cellulare di *Candida albicans*

Tabella 3. - Confronto dell'efficacia antitumorale di cellule intere e frazioni parietali di *Candida albicans* nel modello sperimentale LSTRA/CD2F1.

TIPO DI IMMUNOADIUVANTE (b)	Animali non trattati con BCNU (f)			Animali trattati con BCNU		
	MST (c)	LTS (d) %	P (e)	MST	LTS %	P
Nessuno .....	8,0	0	—	15	0,0	—
Cellule intere.....	11,0	0	< 0,05	> 60	50,0	< 0,01
Mannano .....	8,0	0	> 0,05	16	0,0	> 0,05
Glucano-proteina .....	8,5	0	> 0,05	16	0,0	> 0,05
Ghosts parietali di glucano .....	11,0	0	< 0,05	25	14,3	< 0,01

(a) Il LSTRA è un linfoma murino istocompatibile nel topo CD2F1 (Balb/c × DBA/2) F1 (H2<sup>d</sup>-H2<sup>d</sup>).

(b) Per la preparazione, l'isolamento e la purificazione delle frazioni, vedi Ref. (8, 9, 10).

(c) Tempo di sopravvivenza mediana (espresso in giorni).

(d) Percentuale di sopravvissuti a lungo termine (> 60 giorni).

(e) Probabilità calcolata secondo il test non-parametrico di Mann-Whitney (U-test).

(f) Bis-chloroetil-nitroso-urea, un chemioterapico antitumorale somministrato per via i.p., in dose di 18 mg/Kg, al giorno +5 rispetto al challenge tumorale (giorno 0, 10<sup>5</sup> cellule LSTRA) ed all'inoculazione di immunoadiuvante (i giorni -14, +1, i p).

*C. albicans* e le sue pareti cellulari sono forti immuno-adiuvanti in modelli leucemici sperimentali, in particolare quando siano opportunamente combinati con alcuni chemioterapici [4, 8, 9]. I nostri tentativi di caratterizzare i componenti parietali cui attribuire gli effetti antitumorali, quantunque non abbiano portato ad un grado di purezza molecolare del tipo di quella delle pareti dei micobatteri, hanno permesso di individuare un componente attivo antitumorale nel glucano-insolubile fortemente polimerizzato ed hanno escluso che i complessi manno-proteici siano dotati di tale attività, anche se essi possono modulare l'effetto antitumorale di cellule intere. In una qualche armonia con quanto dimostrato sopra a proposito dell'MDP, è stato anche dimostrato che una certa

complessità molecolare sembra essenziale per l'effetto antitumorale in quanto tutti i glucani a basso peso molecolare ottenuti dalla parete cellulare in forma solubile sono privi di qualsiasi effetto antitumorale (Tab. 3) [9, 10].

Non mi sembra sia il caso di trarre conclusioni generali dai pochi esempi sull'attività adiuvante antitumorale delle strutture microbiche di cui ho parlato in questa comunicazione. Si può solo concludere dicendo che i microrganismi con le loro peculiari strutture biochimiche, ancora una volta costituiscono una sorgente di stimolanti ed attraenti studi biologici questa volta finalizzati alla risoluzione di uno dei fondamentali problemi della medicina moderna, quello del controllo della crescita tumorale.

#### BIBLIOGRAFIA

1. WEISS, D. 1980. Tumor antigenicity and approaches to tumor immunotherapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **89**: 1-83.
2. SPREAFICO, F., CANDIANI, G. & SIRONI, M. 1979. Gli agenti immunostimolanti: alcuni problemi. *G. Ital. Chemioter.* **26**: 121-128.
3. SCHULTZ, R. M. 1981. Factors limiting tumoricidal function of interferon-induced effector systems. *Cancer Immunol. Immunother.* **61-66**.
4. MARCONI, P., CASSONE, A., TISSI, L., BACCARINI, M., PUGGETTI, P., GARACI, E., BONMASSAR, E. & BISTONI, F. 1982. Cellular mechanisms underlying the adjuvant activity of *Candida albicans* in a mouse lymphoma model. *Int. J. Cancer.* **29**: 483-488.
5. CHEDID, L. 1978. Therapeutic potential of immunoregulating synthetic glycopeptides. *Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia.* **43**: 219-232.
6. SAIKI, I., TANIO, Y. & AZUMA, I. 1981. Adjuvant activity of quinonyl-N-acetyl muramyl dipeptides in mice and guinea pigs. *Infect. Immun.* **31**: 114-121.
7. CASSONE, A., MATTIA, E. & BOLDRINI, L. 1978. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* with Concanovolin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and ultrastructure of cell wall. *J. Geb. Microbiol.* **105**: 263-272.
8. BISTONI, F., MARCONI, P., PIZURRA, M., FRATI, L., SPREAFICO, F., GOLDIN, A. & BONMASSAR, E. 1979. Combined effects of BCG or *Candida albicans* (CA) with antitumor agents against a virus-induced lymphoma in mice. *Eur. J. Cancer.* **15**: 1305-1312.
9. CASSONE, A., MARCONI, P., BISTONI, F., MATTIA, E., SBARAGLIA, G., GARACI, E. & BONMASSAR, E. 1981. Immunoadjuvant effects of *Candida albicans* and its cell wall fractions in a mouse lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* **10**: 181-190.
10. CASSONE, A., BISTONI, F., CENCI, E., PESCE, C. D., TISSI, L. & MARCONI, P. 1982. Immunopotential of anticancer chemotherapy by *Candida albicans*, other yeasts and insoluble glucan in an experimental lymphoma model. *Sabourandia.* **20**: 115-125.

## Relazione

# Attività immunoadiuvante antitumorale e meccanismi immunoregolatori dei livelli e dei loro componenti

PIERFRANCESCO MARCONI, FRANCESCO BISTONI

Istituto di Microbiologia Medica, Università degli Studi, Perugia

**Riassunto.** - *I lieviti e i loro componenti sono in grado di interferire con il sistema immune modulandone le funzioni. Gli aspetti più interessanti di questa interazione sono rappresentati da: 1) potenziamento dell'attività fagocitaria; 2) attivazione di risposte naturali antitumorali; 3) aumento delle risposte T-dipendenti. In particolare, Candida albicans è in grado di aumentare le resistenze antitumorali in modelli murini e questo effetto viene amplificato da idonei trattamenti chemoterapici. In conclusione, l'evidenza fin qui accumulata rende interessanti ulteriori studi volti a definire le strutture chimiche di lievito capaci di promuovere effetti immunoregolatori.*

**Summary** (Antitumor Immunoadjuvant Activity and Immunoregulatory Mechanisms of Yeast Cells and their Components). - *Yeasts and their components are able to modulate several aspects and responses of the immune system. These include: 1) potentiation of phagocytosis; 2) induction of antitumor natural responses; 3) potentiation of T-dependent arms of the immune system. In particular, Candida albicans is capable to enhance the antitumor host resistance in several murine models, this effect being further augmented by combination with suitable chemotherapeutic drugs. In conclusion, the evidence which has so far been accumulated suggests that further studies aimed at defining chemical structures of yeast cells responsible of definite immunoregulating properties may have important applications.*

## INTRODUZIONE.

Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di una immunità specifica verso tumori indotti da carcinogeni chimici, virus oncogeni e verso alcuni tumori sperimentali [1]. Accanto a questa immunità specifica sono stati descritti subset cellulari citotossici verso tumori non antigenici considerati parte di un sistema di resistenze naturali [2, 3]. I risultati di questi studi hanno suggerito che una serie di meccanismi effettori immunologici possano ostacolare lo sviluppo dei tumori e la diffusione delle metastasi [4].

Se da un lato c'è la possibilità che il sistema immune eserciti un efficace controllo sulla progressione del tumore, dall'altro è frequente la dimostrazione, nei pazienti neoplastici, della depressione di alcune fun-

zioni immuni in relazione alla crescita del tumore stesso e/o alla chemioterapia antitumorale [5]. Tutto ciò ha suggerito che il recupero dallo stato di depressione e (o) il potenziamento delle funzioni del sistema immune possano contribuire all'arresto della crescita neoplastica [6]. Per raggiungere questo obiettivo sono state condotte una serie di ricerche per lo studio di sostanze od agenti microbici in grado di stimolare il sistema immune [7]. Tra questi il primo in ordine di tempo è stato lo zimosan (pareti di cellule di lievito) [8], seguito poi dal Bacillo di Calmette Guerin (BCG) [9] e dal *Corinebacterium parvum* (CP) [10].

I risultati ottenuti in sistemi sperimentali e soprattutto la capacità di inibire la crescita dei tumori negli animali da parte dello zimosan [11], del BCG [12] e del CP [13], hanno portato ad una diretta applicazione clinica di questi agenti microbici, in particolare del BCG [14-16]. Tuttavia, il tentativo di stimolare aspecificamente le difese immunologiche nell'uomo mediante questi germi è stata fino ad ora deludente per le seguenti ragioni: a) effetti tossici sistemici talvolta gravi [17-20]; b) mancanza di conoscenze biologiche ed immunologiche di base sulla complessa interazione microrganismo-sistema immune [21]; c) impossibilità di stabilire dosi e tempi e vie ottimali di somministrazione di tali agenti, in relazione soprattutto alle terapie antiblastiche, al numero di cellule tumorali presente nell'ospite e agli effetti immunosoppressivi talvolta conseguenti la loro somministrazione. Da queste considerazioni, consegue la necessità che una applicazione clinica degli immunoadiuvanti microbici (IA) debba partire da uno studio di base che: 1) scomponga la complessità strutturale del germe permettendo così la utilizzazione di componenti purificati; 2) caratterizzi i processi attraverso i quali queste sostanze potenziano il sistema immune.

Per quanto riguarda i lieviti, solo in questi ultimi anni sono stati raccolti dati sperimentali sulla attività antitumorale della *Candida albicans* [22, 23] dello scheletro di glucano della *C. albicans* [24] e del glucano a basso peso molecolare di *Saccharomyces cerevisiae* [25]. I risultati di questa relazione suggeriscono che i lieviti possono essere importanti per uno studio approfondito sulla interazione tra agenti immunomodulatori e sistema immune.

## TERMINOLOGIA E DEFINIZIONI.

I risultati discussi in questa relazione riguardano prevalentemente la *C. albicans* (CA), il *Saccharomyces cerevisiae* (SC) ed alcune loro frazioni cellulari ottenute mediante trattamenti chimici. La CA è un fungo dimorfico. Negli studi di immunoadiuvanza antitumorale sono stati usati germi isolati da campioni umani [22, 23] fatti crescere in fase lieviforme pura [22] ed inattivati mediante sodio mercurato o calore [22, 23]. SC è un fungo non dimorfico, che cresce in fase lieviforme. Le preparazioni ottenute dalle cellule intere studiate sono: lo zimosan e due tipi di glucano. Lo zimosan è una frazione della parete del fungo costituita da proteine, lipidi, polisaccaridi complessi come mannano e glucano [26]. Il glucano è un polimero del glucosio costituito da residui di D-glucosio legati in posizione  $\beta$ -1,6 con ramificazioni laterali  $\beta$ -1,3. Esso rappresenta la parte interna della parete dei miceti, mentre all'esterno è presente prevalentemente mannano [27]. I due tipi di glucano fino ad ora studiati differiscono profondamente per tecnica di estrazione e prodotto finale. Essi sono:

1) scheletri di glucano (SG) risultanti dalla drastica estrazione con acido e alcool, che mantengono ancora la forma della cellula originaria [24];

2) glucano a basso peso molecolare (GBPM) (PM 6.500, legami  $\beta$ -1,3) risultato dalla degradazione chimica della rigida struttura della parete [28].

## STIMOLAZIONE DEL SISTEMA LINFRETICOLOENDOTELIALE.

Una singola inoculazione i.v. di CA nei topi, provoca la proliferazione di elementi linfocitocitici e quindi una transitoria spleno ed epatomegalia. Questo fenomeno è dipendente dal numero di CA inoculate [29]. In particolare, le cellule di Kupffer completano la fagocitosi della CA entro 30 minuti dalla inoculazione i.v. Dopo 4 giorni dalla inoculazione i.v., nel fegato compare una reazione granulomatosa con numerosi linfociti che circondano i fori di granulazione [30, 31]. Solo un'alta dose di cellule di CA (15 mg/topo) inocolata s.c. provoca una forte reazione granulomatosa caratterizzata dalla presenza di materiale fibroso ai bordi del tessuto di granulazione e di numerosi macrofagi e leucociti polimorfonucleati. Tuttavia a differenza della inoculazione della CA i.v., gli organi del sistema reticoloendoteliale (SRE) non subiscono cambiamenti [32]. Infine, la inoculazione intradermica di CA nei topi non induce una tipica reazione infiammatoria con formazione di granulomi: infatti, la zona di reazione è circondata da istiociti, ma non da cellule giganti. Nei topi vaccinati con CA, gli effetti infiammatori della successiva inoculazione intradermica non differiscono da quelli nei topi non vaccinati. Il fenomeno infiammatorio dopo inoculazione di CA i.d. si manifesta, anche se gli animali sono stati precedentemente timectionizzati o irradiati [33]. Anche le pareti di CA ed i complessi polisaccaride-proteina estratti dalle cellule, inoculati i.v., inducono una forte iperplasia del SRE come dimostrato dalla aumentata clearance di materiale particolato. Il complesso polisaccaride-proteina aumenta l'attività fagocitica del SRE anche dopo inoculazione i.p. [29].

Anche lo zimosan inoculato i.v. è capace di provocare l'iperplasia del SRE, suggerendo che il responsabile della iperplasia è un componente della parete delle cellule del lievito [8]. Infatti, nel topo pareti isolate di cellule di CA inoculate i.v. provocano una reazione granulomatosa paragonabile a quella indotta da cellule intere di CA [30, 31]. Inoltre, se inoculate s.c. ad alta concentrazione, le pareti di CA inducono una reazione granulomatosa identica a quella provocata da cellule intere [33]. Ulteriori studi, infine, hanno dimostrato che il glucano insolubile della parete è il responsabile della intensa stimolazione del SRE [28, 34]. Ripetute inoculazioni i.v. di GBPM provocano infatti la iperplasia della milza, del fegato e dei polmoni [35]. Dopo la localizzazione nelle cellule epatiche, il glucano induce una reazione granulomatosa con iperplasia ed ipertrofia dei macrofagi residenti. Il fenomeno infiammatorio si mantiene per diverse settimane ed è probabilmente dovuto alla prolungata persistenza di glucano (circa 90 giorni), solo parzialmente degradato all'interno dei fagociti: infatti, il legame  $\beta$ -glicosidico dei residui di glucosio che formano la struttura glucanica è un punto di difficile degradazione per gli enzimi dei fagociti [30, 31, 36]. La risposta proliferativa dei macrofagi del SRE dopo somministrazione i.v. di GBPM è accompagnata da attivazione fagocitica di queste cellule [36-39]: infatti, nel topo aumenta nettamente la clearance di materiale particolato [38]. Inoltre, il GBPM provoca un'aumentata produzione di macrofagi e granulociti, probabilmente attraverso la incrementata liberazione di *colony stimulating activity*, da parte dei macrofagi attivati dal glucano [40].

## STIMOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNE.

A) *Immunità umorale.* - Pochi dati sono noti sulle capacità dei lieviti di potenziare le risposte immuni umorali. È di interesse il fatto che la CA si trova normalmente nella flora microbica delle mucose dello uomo e degli animali e che a causa di ciò induce normalmente la formazione di bassi livelli di anticorpi verso gli antigeni di superficie mannanici [41, 42]. La CA inoltre incrementa debolmente nel topo la risposta primaria verso globuli rossi di montone, mentre incrementa la risposta verso la anatossina tetanica [Marconi *et al.*, dati non pubblicati]. Lo zimosan, invece, aumenta nettamente, nel ratto, la produzione di emolisine [43], mentre il glucano solo in determinate condizioni sperimentali stimola le risposte immuni umorali [44, 45].

B) *Immunità cellulare.* - La CA è un comune abitante delle membrane mucose dell'uomo [46]. Come conseguenza della colonizzazione e della persistenza nel tratto alimentare e mediante infezioni mucocutanee subcliniche [47] provoca uno stato di ipersensibilità nella maggior parte delle persone adulte [48] con casistiche di positività che vanno dal 63% in pazienti ospedalizzati [49] al 95% in persone sane [50]. *In vitro*, inoltre, un estratto di CA provoca la blastizzazione di linfociti nel 100% delle persone sane [51]. La persistenza di CA nelle mucose di altre specie animali è probabilmente la causa della presenza di una ipersensibilità ritardata in assenza di stimolazioni sperimentali [46, 52, 53]. Infatti, a differenza di topi

germ-free, topi normali dopo inoculazione s.c. di antigeni della CA hanno una risposta positiva cutanea di ipersensibilità di tipo ritardato [52, 53]. Nelle cavie non trattate, la reazione di ipersensibilità cutanea ritardata verso la CA è ancora più vistosa che nei topi [23]. Anche pareti di CA inoculate in topi e ratti, provocano una reazione di ipersensibilità ritardata. Nei ratti germ-free la reazione è assente, a meno che gli animali non siano stati precedentemente infettati con CA viva [53]. La sensibilizzazione verso la CA aumenta se gli animali vengono vaccinati con cellule intere o pareti di CA, mentre materiale cellulare non particolato risulta inefficace [54]. Negli animali vaccinati, la inoculazione s.c. di un estratto di CA, provoca una reazione ritardata (24-48 h), molto più vistosa rispetto agli animali di controllo non pretrattati. Nel punto di inoculazione della CA, c'è un'intensa reazione granulocitica e più perifericamente una risposta granulocitica e mononucleare [53, 54]. A conferma della presenza di uno stato di sensibilizzazione verso la CA, i linfociti di ratti normali, ma non quelli da ratti germ-free, hanno una forte risposta blastogenica *in vitro* verso l'estratto di CA [55]. Infine, i linfociti o il loro RNA immune, provenienti da animali ripetutamente stimolati con CA inattivata sono in grado di trasferire la ipersensibilità ritardata verso la CA negli animali normali o germ-free [54, 58].

C) *Resistenza alle infezioni.* - Il pretrattamento di topi con CA inattivata protegge gli animali da una successiva dose letale di CA [57-60]. Anche il pretrattamento con glucano aumenta la resistenza verso l'infezione con CA [61]. La resistenza indotta da glucano (componente non antigenico) [62], non è dovuta ad una reazione crociata con antigeni superficiali della CA, ma piuttosto ad una intensa stimolazione del SRE. Questa ipotesi è valida sia per la resistenza verso l'infezione da CA che verso le infezioni da *Sporotrichum schenckii* [63], *Cryptococcus neoformans*, *Micobacterium leprae* [64] e *S. aureus* [65]. Infine il glucano somministrato i.v. aumenta notevolmente il livello di lisozima serico [65].

D) *Altre proprietà.* - La CA stimola *in vitro* la chemiotassi leucocitaria, attraverso l'attivazione della via alternativa del complemento (C') [66-68]. Anche lo zimosan genera fattori chemiotattici dal C' a differenza del glucano che non ha attività chemiotattica.

Il mannano superficiale della CA provoca una netta migrazione leucocitaria *in vitro* in presenza di C', suggerendo quindi che la struttura responsabile per la chemiotassi indotta dalla CA intera possa essere il mannano superficiale oppure qualche gluco-manno-proteina di parete [69]. Altri risultati invece, indicano che la CA stessa produce in coltura (e quindi probabilmente anche *in vivo*) una sostanza a basso peso molecolare con attività chemiotattica per i polimorfonucleati di cavia. Il fenomeno avviene anche in assenza di C', quindi non è mediato da prodotti chemiotattici generati dall'attivazione del C' [70].

#### CONTROLLO DELLA CRESCITA DEI TUMORI SPERIMENTALI.

«<sup>4</sup>A) *Immunoprofilassi.* - La CA è in grado di curare un'alta percentuale di topi MHL-incompatibili (BD2F<sub>1</sub>) inoculati i.p. con il linfoma LSTRA (tumore indotto

dal virus di Moloney), quando somministrata i.p. prima e dopo il tumore. La resistenza indotta è specifica in quanto gli animali curati resistono poi ad una successiva challenge con lo stesso tumore [22]. Inoltre, la CA sempre somministrata i.p. inibisce in topi compatibili la crescita sottocutanea di tumori indotti dal virus della leucemia di Friend [71].

Il SG, inoculato solo prima del tumore, mentre aumenta la resistenza in topi incompatibili verso il linfoma LSTRA [24], non influenza la crescita di tumori indotti dal virus della leucemia di Friend [71]. Invece il GBPM somministrato ai ratti per via sistemica (sistema semiallogenico) cura un'alta percentuale di animali successivamente inoculati s.c. con la leucemia mielogenica Shay. Anche in questo caso gli animali curati resistono ad una successiva inoculazione dello stesso tumore [25].

B) *Immunoterapia locale.* - CA inoculata nel derma di cavie assieme a dosi letali di cellule di epatoma della linea 10 (epatocarcinoma indotto da dietilnitrosanina) sopprime la crescita del tumore in un'alta percentuale di animali. Inoltre, ripetute inoculazioni intratumorali di CA inducono la regressione dell'epatoma al 7<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> giorno di crescita, quando già le metastasi hanno invaso i linfonodi regionali. Nel punto di inoculazione, la CA provoca una debole ulcerazione suppurativa. Gli animali, dopo la regressione del tumore sono specificamente resistenti ad un successivo inoculo dello stesso tumore in un punto diverso da quello della remissione [23]. Invece la CA, quando viene inoculata i.p. o i.v. in topi incompatibili assieme al linfoma LSTRA non è in grado di controllare la crescita di questo tumore [Marconi et al., dati non pubblicati].

Il GBPM, inoculato nei ratti s.c. assieme a dosi letali del tumore mielogenico Shay, ne inibisce la crescita. Durante le prime 12 h, nel punto di inoculazione del GBPM nel tumore, c'è un notevole accumulo di macrofagi [72]. Risultati negativi invece sono stati ottenuti quando il GBPM è stato inoculato s.c. assieme a 5 diversi tumori (carcinoma epatocellulare, fibrosarcoma, melanoma ed adenocarcinoma) in sistemi murini compatibili [73]. In questi esperimenti, comunque, sono state usate dosi di glucano superiori a quelle utilizzate con il tumore di Shay nel sistema semiallogenico.

C) *Immunoterapia sistemica.* - Il GBPM inoculato ripetute volte per via endovenosa in ratti con il tumore mielogenico Shay sistemico, cura un'alta percentuale di animali. Il tumore continua a svilupparsi durante il trattamento con il GBPM per circa 8 giorni, poi regredisce completamente. Gli stessi risultati protettivi si ottengono quando il tumore viene inoculato s.c. ed il GBPM i.v. Invece l'attività antitumorale scompare se il GBPM viene dato s.c. in un punto diverso dalla crescita del tumore [72]. In sistemi compatibili, tumore-ospite, il GBPM inoculato i.v. riduce la crescita sottocutanea dell'adenocarcinoma BW10232 e del melanoma B 16 [25]. In altri sistemi sperimentali, invece, il GBPM inoculato i.p. non ritarda la crescita di 5 diversi tumori inoculati s.c. in ospiti singeneici [73].

Il mannano estratto da CA inoculato serialmente i.p. od i.v. ritarda la crescita sottocutanea del sarcoma 180. La frazione glucomannanica è più efficace della frazione mannannica. Il mannano, mentre inoculato i.p. non è tossico, lo diviene quando inoculato

i.v. [74]. La tossicità scompare quando il mannano viene trasformato nel suo derivato O-carbosimetilico, mentre viene mantenuta l'attività antitumorale [75].

D) *Associazione con la chemioterapia.* - Fino ad ora si conoscono i risultati solo di un modello sperimentale (linfoma LSTRA inoculato in tempi compatibili CD2F<sub>1</sub>) in cui la CA o il SG sono stati inoculati in combinazione con la chemioterapia antiblastica. In questo sistema la CA potenzia l'attività antitumorale delle nitrosouree. In ogni caso il sinergismo dipende dallo schema di somministrazione della CA e dalla via di inoculazione del tumore; infatti un'alta percentuale di animali viene curata solo quando la CA viene inoculata i.p. prima e dopo il tumore sempre i.p. Tuttavia, l'effetto antitumorale scompare se il linfoma viene inoculato i.v. [22]. L'attività della CA è evidente anche se la prima inoculazione viene fatta in una sede diversa (s.c. o i.v.) da quella della successiva inoculazione del tumore (i.p.), a condizione che la seconda dose (*boosting*) venga fatta i.p. (sede di crescita del tumore). Poiché il linfoma LSTRA metastatizza entro poche ore dalla inoculazione i.p., la CA nella cavità peritoneale è in grado di attivare una risposta sistemica che, in combinazione con la chemioterapia, eradica il tumore (alta percentuale di animali curati) [76]. In questo sistema sperimentale la CA attiva una risposta verso il tumore che cresce nel peritoneo, in grado di inibire la crescita di una dose letale di linfoma concomitante inoculata i.v. nello stesso animale. Questo fenomeno di induzione di resistenza sistemica è dipendente anche dal numero di cellule tumorali presenti nel peritoneo al momento della seconda dose di CA, suggerendo la necessità di un sufficiente carico antigenico (numero di cellule tumorali adeguato) per la specifica sensibilizzazione dell'ospite verso il tumore [77]. L'attività antitumorale della CA scompare negli animali irradiati (400R) o nei topi congenitamente atimici [78]. Il SG potenzia l'attività antitumorale della chemioterapia anche se inoculato una volta sola prima del tumore [24]. Il mannano solubile o il glucano estraibile dalla parete di CA invece non sinergizzano con la chemioterapia antiblastica [79].

E) *Modo di azione.* - Macrofagi provenienti da topi trattati in CA i.p. hanno attività citostatica [78] e citotossica [23] contro linee tumorali *in vitro*. Numerosi dati indicano che i macrofagi possono essere le cellule effettrici fondamentali della resistenza antitumorale indotta *in vivo* dal GBPM. Infatti: a) la regressione del tumore sottocutaneo BW 10232 (carcinoma mammario) dopo ripetute somministrazioni di GBPM è accompagnata da un concomitante accumulo di macrofagi nella sede del tumore. Il metilpalmitato (inibitore della funzione macrofagica) abolisce la attività antitumorale del glucano [34]; b) il pretrattamento dei topi C57BL/6H con GBPM, aumenta la clearance polmonare di cellule singeniche, del melanoma B 16. Il numero di metastasi polmonari è correlabile con l'attività di clearance ed è ridotto significativamente negli animali trattati con GBPM [80]; c) macrofagi provenienti da topi trattati con GBPM sono estremamente citotossici *in vitro* verso diverse linee di cellule tumorali [81]; d) macrofagi peritoneali provenienti da ratti trattati con GBPM, inoculati s.c. assieme al tumore Shay, ne inibiscono significativamente la crescita anche nel rapporto 1:1 macrofago/cellula tumorale [82].

Il GBPM potenzia l'attività antitumorale dei macrofagi anche attraverso l'aumento di una proteina serica, una  $\alpha_2$ -macroglobulina (HRF). Sembra che questa proteina, assorbendosi sulle cellule tumorali, intensifichi la capacità citocida dei macrofagi attivati. Inoltre, l'HRF è fortemente chemiotattica e, in alcuni modelli sperimentali, inibisce la crescita di tumori primari e metastatici [83]. Il livello di lisozima serico parallela il numero e il grado di attivazione macrofagica GBPM indotta [34].

Mentre la CA inoculata i.p. nei topi C57BL/6H non potenzia nelle cellule di milza le risposte naturali verso i tumori (attività delle cellule *natural killer*) [78], il glucano inoculato i.v. ad alte dosi, deprime il normale livello di reattività naturale sia nella milza che nel midollo osseo [84].

Alcuni dati suggeriscono inoltre che l'attività antitumorale della CA possa essere Tdipendente. Infatti, il sinergismo tra CA e farmaco antineoplastico scompare nei topi congenitamente atimici o dopo irradiazione totale degli animali (i macrofagi sono resistenti a moderati livelli di radiazioni) [78]. Rimane comunque da definire quale ruolo possano giocare nella resistenza antitumorale indotta *in vivo* dalla CA le risposte immuni dell'ospite contro gli antigeni della CA verso i quali esiste un normale stato di sensibilizzazione [46, 48]. A questo proposito è suggestivo il fatto che la CA *in vitro* induca linfociti umani normali periferici a divenire citotossici contro linee tumorali umane [85]. Invece l'attività antitumorale del glucano è probabilmente indipendente dalle risposte immuni specifiche dell'ospite, non essendo di per sé immunogenico [30, 31].

#### APPLICAZIONI CLINICHE.

La CA non è ancora stata utilizzata in studi clinici controllati. Il GBPM, inoculato nell'uomo e negli animali non determina gli effetti tossici che spesso si verificano dopo la somministrazione del BCG [25]. Studi clinici preliminari hanno dimostrato che l'inoculazione di GBPM nei noduli metastatici cutanei provoca la necrosi di circa il 70% delle cellule tumorali entro 48 ore. Istologicamente si evidenzia nella sede del tumore un notevole accumulo di macrofagi attivati, tuttavia non è stato ancora valutato l'effetto del GBPM su noduli cutanei distanti da quelli trattati. Nel punto di regressione del tumore indotto da GBPM non si è avuta la ricorrenza di una nuova metastasi [86, 87]. È stato dimostrato che il GBPM aumenta il livello di una proteina serica (HRF) che intensifica l'attività citocida dei macrofagi verso le cellule tumorali [83].

L'HRF diminuisce in alcune condizioni cliniche, come interventi chirurgici [88], ustioni [89] e nei pazienti con tumore [90, 91], in cui è stata suggerita la presenza di una parziale depressione immune. Nei pazienti con tumore la concentrazione serica dell'HRF è stata correlata con la prognosi del tumore.

La somministrazione di HRF direttamente nelle metastasi cutanee richiama efficacemente i macrofagi provocando così una estesa necrosi del tessuto tumorale [86]. Quindi la somministrazione di GBPM che aumenta il livello di HRF può contribuire ad aumentare le resistenze antitumorali e generali dell'ospite.

## CONCLUSIONI.

*C. albicans*, *S. cerevisiae* ed i componenti della parete cellulare, come glucano e mannano hanno permesso di definire alcuni punti importanti nella complessa interazione tra sostanze immunomodulanti e sistema immune.

Il primo aspetto da sottolineare è che le cellule intere di lievito o parti di esse provocano effetti diversificati sul sistema immune. Infatti, il GBPM: *a*) è un forte attivatore del SRE; *b*) aumenta la resistenza verso le infezioni batteriche; *c*) eleva i livelli serici di lisozima; *d*) aumenta i livelli serici di HRF potenziando così la fagocitosi macrofagica; *e*) non è antigénico.

La CA, a sua volta: *a*) ha un'attività chemiotattica mediata direttamente da un componente della parete o indirettamente mediante attivazione della via alternativa del C'; *b*) è molto antigenica; *c*) l'uomo e gli animali sono naturalmente sensibilizzati verso i suoi componenti superficiali antigenici. Per quanto riguarda le capacità immunoadiuvanti antitumorali le cellule intere dei lieviti differiscono dai loro compo-

nenti. Infatti: 1) l'attività antitumorale *in vivo* della CA si manifesta solo se inocolata nella sede di crescita del tumore (i.p. o s.c.); 2) il GBPM in alcuni sistemi sperimentali aumenta la resistenza sistemica verso il tumore; 3) mannano e glucomannano ritardano la crescita del tumore in sistemi semicompatibili; 4) CA e SG sinergizzano con la chemioterapia antiblastica ma non il mannano; 5) il GBPM rende i macrofagi fortemente citotossici verso le cellule tumorali, mentre deprime l'attività delle cellule NK; 6) la CA attiva debolmente i macrofagi, non modifica le risposte NK delle cellule di milza e aumenta probabilmente la risposta T verso le cellule tumorali.

In conclusione, la *C. albicans* e l'*S. cerevisiae* sia come cellule intere che come frazioni purificate hanno effetti differenti sul sistema immune, dipendendo dalle caratteristiche del componente usato e dal tipo di interazioni che tali componenti hanno con le diverse funzioni immunologiche. Questa complessa interazione tra lieviti e sistema immune sottolinea la necessità di selezionare componenti purificati, privi di effetti tossici per l'uomo, capaci di modulare prevalentemente singole funzioni immuni.

## BIBLIOGRAFIA

1. KLEIN, G. 1975. Immunological surveillance against neoplasia. *Harvey Lect.* **69**: 71-102.
2. KIESSLING, R. & WIGZELL, H. 1979. An analysis of the murine NK cells as to structure, function and biological relevance. *Immunol. Rev.* **44**: 165-208.
3. HERBERMANN, R. B. & HOLDEN, H. T. 1978. Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* **27**: 305-307.
4. HERBERMANN, R. B. 1974. Cell-mediated immunity to tumor cells. *Adv. Cancer Res.* **19**: 207-263.
5. KAMO, I. & FRIEDMAN, H. 1977. Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. *Adv. Cancer Res.* **25**: 271-321.
6. RAPP, H. J. 1977. Of cavies and men: the property and rationality of «Cancer immunotherapy». *J. Natl. Cancer Inst.* **59**: 1577-1579.
7. WHITHE, R. G. 1976. The adjuvant effect of microbial products on the immune response. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 579-600.
8. BENACERRAF, B. & SEBESTYEN, N. M. 1957. Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial system. *Fed. Proc.* **16**: 860-867.
9. ROSENTHAL, S. R. 1957. *BCG vaccination against tuberculosis*. Little Brown, Boston, Massachusetts.
10. MC BRIDE, W. H., DAVES, J., DUMBAR, N., GHAFFAR, A. & WOODRUFF, M. F. A. 1975. A comparative study of anaerobic Coryneforms. Attempts to correlate their antitumor activity with their serological properties and ability to stimulate the lymphoreticular system. *Immunology.* **28**: 49-58.
11. OLD, L. J., CLARKE, D. A., BENACERRAF, B. & GOLDSMITH, M. 1960. The reticuloendothelial system and the neoplastic process. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **88**: 264-280.
12. OLD, L. J., BENACERRAF, B., CLARKE, D. A., CARSWELL, E. A. & STOCKERT, E. 1961. The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.* **21**: 1281-1301.
13. HALPERN, B. N., BIOZZI, G., STIFFEL, C. & MOUNTON, D. 1966. Inhibition of tumor growth by administration of killed *C. parvum*. *Nature*. London. **212**: 853-854.
14. ISRAEL, L. & HALPERN, B. N. 1972. Le *Corynebacterium parvum* dans cancers avances. *Nouv. Presse Med.* **1**: 19-23.
15. ZBAR, B. & TANAKA, T. 1971. Immunotherapy of cancer: regression of tumor after intralésional injection of living *Mycobacterium bovis*. *Science.* **172**: 271-273.
16. MANSER, P. W. A., ICHINOSE, H., RIED, R. J., KREMENTZ, E., MC NAMEE, R. & DI LUZIO, N. R. 1975. Macrophage-mediated destruction of human malignant cells *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 571-580.
17. SPARKS, F. C., SILVERSTEIN, M. J., HUNT, J. S., HASKELL, C. M., PILCH, Y. H. & MORTON, D. L. 1973. Complications of BCG immunotherapy in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.* **289**: 827-830.
18. AUNGST, C. W., SOKAL, J. E. & JAGER, B. V. 1975. Complications of BCG vaccination in neoplastic disease. *Ann. Intern. Med.* **82**: 666-669.
19. PROCTOR, J. W., ZIDAR, B., POMERANTZ, M., YAMAMURA, Y., ENG, C. P. & WOODSIDE, D. 1978. Anaphylactic reaction to intralésional BCG. *Lancet.* **1**: 162.

20. JONES, J. T., MCBRIDE, W. H. & WEIR, D. M. 1975. The *in vitro* killing of syngenic cells by peritoneal cells from adjuvant-stimulated mice. *Cell. Immunol.* **18**: 375-383.
21. WEISS, D. W. 1975. *Immunobiology of tumor-host relationship*. R. T. Smith & M. Landy (Ed.). Academic Press, New York, pp. 327-330.
22. BISTONI, F., MARCONI, P., PITZURRA, M., FRATI, L., SPREAFICO, F., GOLDIN, A. & BONMASSAR, E. 1979. Combined effects of BCG or *Candida albicans* (CA) with antitumor agents against a virus-induced lymphoma in mice. *Eur. J. Cancer.* **15**: 1305-1314.
23. WEINBER, J. B. & HIBBS, J. B. 1979. Enhanced macrophage tumoricidal activity and tumor suppression or regression caused by heat-killed *Candida albicans*. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**: 1273-1278.
24. CASSONE, A., MARCONI, P., BISTONI, F., MATTIA, E., SBARAGLIA, G., GARACI, E., & BONMASSAR, E. 1981. Immunoadjuvant effects of *Candida albicans* and its cell wall fractions in a mouse lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* **10**: 181-190.
25. MANSELL, P. W. A., DI LUZIO, N. R., MC NAMEE, R., ROWDEN, G. & PROCTOR, J. W. 1976. Recognition factors and non specific macrophage activation in the treatment of neoplastic disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **277**: 20-44.
26. DI CARLO, F. J. & FIORE, J. W. 1958. On the composition of zymosan. *Science.* **127**: 756-757.
27. HERBERT, D., PHIPPS, P. S. & STRANGE, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* **5B**: 209-344.
28. RIGGI, S. J. & DI LUZIO, N. R. 1961. Identification of a reticuloendothelial agent in zymosan. *Am. J. Physiol.* **200**: 297-300.
29. TRNOVEC, T., GAJDOSIK, A., BEZEK, S., SIKE, D., KOPRDA, V., ZEMANEK, M. & FABEROVA, V. 1977. The effect of fractions isolated from *Candida albicans* on phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice. *J. Ret. Soc.* **22**: 111-119.
30. MEISTER, H., HEYMER, B., SCHAFER, H. & HAFERKAMP, O. 1977. Role of *Candida albicans* in granulomatous tissue reactions. I) *In vitro* degradation of *C. albicans* and immunospecificity of split products. *J. Infect. Dis.* **135**: 224-234.
31. MEISTER, H., HEYMER, B., SCAFER, H. & HAFERKAMP, O. 1977. Role of *Candida albicans* in granulomatous tissue reactions. II) *In vivo* degradation of *C. albicans* in hepatic macrophages of mice. *J. Infect. Dis.* **135**: 235-242.
32. CUTLER, J. E., FRIEDMAN, L. & MILNER, K. C. 1972. Biological and chemical characterization of toxic substances from *Candida albicans*. *Infect. Immunol.* **6**: 616-627.
33. GIGER, D., DOMER, J. & MC QUITTY, J. 1978. Experimental murine candidiasis: pathological and immune response to cutaneous inoculation with *Candida albicans*. *Infect. Immunol.* **19**: 499-509.
34. DI LUZIO, N. R., GILBERT, K. M. & SPANJERS, M. A. 1980. Comparative evaluation of macrophage stimulation and depression on tumor growth and macrophage content and function in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **9**: 37-42.
35. DI LUZIO, N. R. 1976. Pharmacology of the reticuloendothelial system: accent on glucan. In: *The reticuloendothelial system in health and disease, functions and characteristics*. S. Reichard, M. Escobar & H. Friedman (Eds.). Plenum Press, New York, 128 pp.
36. ASHWORTH, C. T., DI LUZIO, N. R. & RIGGI, S. J. 1963. A morphologic study of the effect of reticuloendothelial stimulation upon hepatic removal of minute particles from the blood of rats. *J. Exp. Mol. Pathol. Suppl.* **1**: 83-103.
37. WOOLLES, W. R. & DI LUZIO, N. R. 1963. Reticuloendothelial function and the immune response. *Science.* **145**: 1078-1080.
38. WOOLLES, W. R. & DI LUZIO, N. R. 1964. The phagocytic and proliferative response of the reticuloendothelial system following glucan administration. *J. Reticuloendothel.* **1**: 160-168.
39. HOFFMANN, E. O., DI LUZIO, N. R., COOK, J. A., MCNAMEE, R. & ARMOSTRONG, K. 1977. The morphologic effects of glucan in the liver, lung and spleen of the rat: light and electron microscopic studies. *Lab. Invest.* **36**: 340-346.
40. BURGALEYA, C. & GOLDE, D. 1977. Effect of glucan on granulopoiesis and macrophages genesis in mice. *Cancer Res.* **37**: 1739-1742.
41. WINNER, H. I. 1955. A study of *Candida albicans* agglutinins in human sera. *J. Hyg.* **53**: 509-573.
42. MARCONI, P., BISTONI, F., MOSCI, L., VECCHIARELLI, A., TISSI, L. & PITZURRA, M. 1977. Anti-*Candida albicans* precipitating antibodies in the sera of surgery patients. *Boll. Ist. Sier. Mil.* **56**: 321-327.
43. CUTLER, J. L. 1960. The enhancement of hemolysin production in the rat by zymosan. *J. Immunol.* **84**: 416-419.
44. WOOLLES, W. R. & DI LUZIO, N. R. 1963. Reticuloendothelial function and the immune response. *Science.* **142**: 1078-1080.
45. DI LUZIO, N. R., WOOLLES, W. R. & MORROW, S. H. 1964. Effect of splenectomy and X-irradiation on antibody formation in reticuloendothelial hyperfunctional mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* **1**: 429-438.
46. KOZINN, P. J. & TASCHDJIAN, C. L. 1963. Pathogenesis, epidemiology and prevention of neonatal oral thrush. *Pediatr. Dig.* **5**: 5-15.
47. KOZINN, P. J. & TASCHDJIAN, C. L. 1962. Enteric candidiasis: diagnosis and clinical considerations. *Pediatrics.* **30**: 70-85.
48. WARA, D. W. & AMMANN, A. J. 1975. Laboratory data. In: *Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency*. Academic Press, New York, pp. 247-254.
49. PALMER, D. L. & REED, W. P. 1974. Delayed hypersensitivity skin testing. I) Response rates in a hospitalized population. *J. Infect. Dis.* **130**: 132-137.
50. SHANNON, D. C., JOHNSON, G. & ROSEN, F. S. 1966. Cellular reactivity to *Candida albicans* antigen. *N. Engl. Med.* **275**: 690-693.
51. ALFORD, R. H. 1973. Transformation of lymphocytes of normal and hospitalized adults by *Candida albicans* extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **144**: 826-829.
52. SAVAGE, D. & DUBOS, R. 1967. Localization of indigenous yeast in the murine stomach. *J. Bacteriol.* **94**: 1811-1816.
53. EVRON, R. 1980. *In vitro* phagocytosis of *Candida albicans* by peritoneal mouse macrophages. *Infect. Immun.* **28**: 963-971.

54. RIFKIND, D., FREY, J. A., DARUS, J. R., PETERSEN, F. A. & DINOWITZ, M. 1976. Delayed hypersensitivity to fungal antigens in mice. Use of the intradermal skin and footpad swelling test as assays of active and passive sensitization. *J. Infect. Dis.* **113**: 50-56.
55. ROGERS, T. & BALISH, E. 1978. Effect of systemic candidiasis on blastogenesis of lymphocytes from germfree and conventional rats. *Infect. Immun.* **20**: 142-150.
56. PEARSALL, N., ADAMS, B. & BUNNI, R. 1978. Immunologic responses to *Candida albicans*. III) Effects of passive transfer of lymphoid cells or serum on murine candidiasis. *J. Immunol.* **120**: 1176-1180.
57. HASENCLEVER, H. F. & MITCHELL, W. O. 1962. Production in mice of tolerance to the toxic manifestation of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **84**: 402-409.
58. ISENBERG, H. D., ALLERHAND, J. & BERKMAN, J. I. 1963. An endotoxin-like fraction extracted from the cells of *Candida albicans*. *Nature*. London. **197**: 516-517.
59. DOBIAS, B. 1964. Specific and non specific immunity in *Candida* infection. *Acta Med. Scand.* **174**: 4-8.
60. MOURAD, S. & FRIEDMAN, L. 1968. Passive immunization of mice against *Candida albicans*. *Sabouraudia*. **6**: 103-105.
61. WILLIAMS, D., COOK, J., HOFFMAN, E. & DI LUZIO, N. R. 1978. Protective effect of glucan in experimentally induced candidiasis. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.* **23**: 479-490.
62. DI LUZIO, N. R., HOFFMANN, E. O., COOK, J. A., BROWDER, W. & MANSELL, P. W. A. 1977. Glucan-induced enhancement in host resistance to experimental tumours. In: *Control of neoplasia by modulation of the immune system*. Raven Press, N.Y., pp. 475-499.
63. STEVENS, M., STEVENS, P., COOK, J. A., ICHINOSE, H. & DI LUZIO, N. R. 1976. Protective effect of immunostimulant glucan on Sporotrichosis infections in mice. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.* **20**: 66-75.
64. LEJEUNE, F. J., DELVILLE, J., GILLET, J., SONG, M., STADTSBAEDER, S. & JACQUES, P. 1978. Effect of the yeast polysaccharide glucan in transplanted colon carcinoma of the rat and experimental infectious diseases: a preliminary report. *Eur. J. Cancer*. **14**: 328-337.
65. KOKOSHS, P. L., WILLIAMS, D. L., COOK, J. A. & DI LUZIO, N. R. 1978. Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. *Science*. **199**: 1340-1342.
66. RAY, T. L. & WUEPPER, K. O. 1976. Activation of the alternative (properdin) pathway of complement by *Candida albicans* and related species. *J. Invest. Dermatol.* **67**: 700-703.
67. SOHNLE, P. G., FRANK, M. M. & KIRKPATRICK, C. H. 1976. Deposition of complement components in the cutaneous lesions of chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **5**: 340-350.
68. SOHNLE, P. G., FRANK, M. M. & KIRKPATRICK, C. H. 1976. Mechanisms involved in elimination of organisms from experimental cutaneous *Candida albicans* infections in guinea pigs. *J. Immunol.* **117**: 523-530.
69. DENNING, T. J. V. & DAVIES, R. R. 1973. *Candida albicans* and the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Sabouraudia*. **11**: 210-221.
70. CUTLER, J. E. 1977. Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **18**: 568-573.
71. CASSONE, A., GIOIA, L., PESCE, C. D., TITTI, F., BISTONI, F., MARCONI, P. & ROSSI, G. B. 1982. Suppression of Friend leukemia cell-induced tumors by cellular preparations of *Candida albicans*. Submitted for publication.
72. DI LUZIO, N. R., MCNAMEE, R., JONES, E., LASSOFF, S., SEAR, W. & HOFFMANN, E. O. 1976. Inhibition of growth and dissemination of Shay myelogenous leukaemia tumor in rats by glucan and glucan activated macrophages. In: *Proceedings of the VII of the International Congress. Reticuloendothelial Society*. Plenum Publishing Corporation, N.Y., pp. 397-413.
73. HUNTER, J. T., MELTZER, M. S., RIBI, E., FIDLER, I. S., HANNA, M. G., ZBAR, B. & RAPP, H. J. 1978. Glucan: attempts to demonstrate therapeutic activity against five syngeneic tumors in guinea pigs and in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **60**: 419-424.
74. SUZUKI, S., HATSUKAWA, H., SUNAYAMA, H., UCHIJAMA, M., FUKUOKA, F., NAKANISHI, M. & AKIYA, S. 1969. Antitumor activity of polysaccharides. Growth-inhibitory activity of mannan fractions isolated from several species of yeast against sarcoma 180 solid tumor. *Gann*. **60**: 65-69.
75. OKA, S., KUMANO, N. & KUNTA, K. 1972. Antitumor activity of the yeast mannan preparation in relation to the effect of chemical modification. *Gann*. **63**: 365-369.
76. MARCONI, P., BISTONI, F., CASSONE, A., FRATI, L., BACCARINI, M., GARACI, E. & BONMASSAR, E. 1982. The role of peritoneal cavity for successful treatment of a murine lymphoma with chemotherapy and non-specific immunostimulation. *Cancer Immunol. Immunother.* **13**: 128-133.
77. MARCONI, P., CASSONE, A., GARACI, E., BACCARINI, M., BONMASSAR, E., FRATI, L. & BISTONI, F. 1982. Relationship between tumor load and response to immunochemotherapy in a murine lymphoma model. In press.
78. MARCONI, P., CASSONE, A., TISSI, L., BACCARINI, M., PUCCETTI, P., GARACI, E., BONMASSAR, E. & BISTONI, F. 1982. Cellular mechanisms underlying the adjuvant activity of *Candida albicans* in a mouse lymphoma model. *Inter. J. Cancer*. **29**: 483-488.
79. CASSONE, A., BISTONI, F., CENCI, E., PESCE, C. D., TISSI, L. & MARCONI, P. 1982. Further investigations on the immunopotential of anticancer chemotherapy by yeast and insoluble glucan in an experimental lymphoma model. *Sabouraudia*. **20**: 115-125.
80. PROCTOR, J. W., YAMAMURA, Y., DI LUZIO, N. R., MANSELL, P. W. A. & HARNATH, J. 1981. Development of a bioassay for the antitumor activity of biological response modifiers of the reticuloendothelial stimulant class. Correlation with the outgrowth of lung tumor nodules. *Cancer Immunol. Immunother.* **10**: 197-202.
81. DI LUZIO, N. R. 1975. Macrophages, recognition factors and neoplasia. In: *The reticuloendothelial system*. J. W. Rebeck, C. W. Berard & M. R. Abel (Eds.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md, 325 pp.
82. DI LUZIO, N. R., MCNAMEE, R., JONES, E., COOK, J. A. & HOFFMANN, E. O. 1976. The employment of glucan and glucan activated macrophages in experimental animals. In: *The macrophage in neoplasia*. Academic Press, N.Y., pp. 181-199.

83. DI LUZIO, N. R., MCNAMEE, R., OLCAY, I., KITAHAMA, A. & MILLER, R. H. 1974. Inhibition of tumor growth by recognition factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**: 311-315.
84. LOTZOVA, E. & GUTTERMAN, J. U. 1979. Effect of glucan on natural killer (NK) cells: further comparison between NK cell and bone marrow effector cell activities. *J. Immunol.* **123**: 607-611.
85. SHARMA, B., BRUNDA, M. J. & MINDEN, P. 1979. Generation of cytotoxic lymphocytes against human tumor cells in vitro by various soluble microbial extracts. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**: 341-346.
86. MANSSELL, P. W. A., KREMENTZ, E. T., DI LUZIO, N. R., OLCAY, I., MCNAMEE, R. & HOFFMANN, E. O. 1974. Role of macrophages and recognition factors in tumor cells recognition and inhibition: an experimental and clinical study. *Proc. XI Int. Cancer Cong.* **4**: 696-697.
87. MANSSELL, P. W. A., KREMENTZ, E. T. & DI LUZIO, N. R. 1975. Clinical experiences with immunotherapy of malignant melanoma. *Bebringwerk. Mitt.* **56**: 256-262.
88. SCOVILL, W. A. & SARA, T. M., 1973. Humoral recognition deficiency in the etiology of reticuloendothelial depression induced by surgery. *Ann. Surg.* **178**: 59-64.
89. GOLDMAN, A. S., RUDLOFF, H. B., MCNAMEE, R., LOOSE, L. D. & DI LUZIO, N. R. 1974. Deficiency of plasma humoral recognition factor activity following burn injury. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.* **15**: 193-198.
90. PISANO, J. C., DI LUZIO, N. R. & SOLKY, N. K. 1970. Absence of macrophage humoral recognition factor(s) in patients with neoplasia. *J. Lab. Clin. Med.* **76**: 141-150.
91. PISANO, J. C., JACKSON, J. P., DI LUZIO, N. R. & ICHINOSI, H. 1972. Dimension of humoral recognition factor depletion in carcinomatous patients. *Cancer Res.* **32**: 11-15.

## Comunicazioni

# Ulteriore indagine sull'immunopotenziamento della terapia antiblastica sperimentale mediante lieviti inattivati e glucano

CATERINA DELFINA RESGE (a), MARIA BOCCANERA (a), PIERFRANCESCO MARCONI (b),  
FRANCESCO BISTONI (b), ELIO CENCI (b), LUCIANA TISSI (b) e ANTONIO CASSONE (a)

(a) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma;

(b) Istituto di Microbiologia, Università di Perugia

**Riassunto.** - Vari microrganismi lievitoformi mostrano elevato potere immunoadiuvante, sinergico con la chemioterapia, nei riguardi di un linfoma murino virus-indotto istocompatibile. Risultati ottimali si ottengono mediante due somministrazioni intraperitoneali di  $2 \times 10^7$  cellule lievito inattivate ai giorni -14 e +1 (rispetto all'inoculazione del tumore al giorno 0) seguite da trattamento con farmaci antiblastici al giorno +5. L'effetto antitumorale di *Candida albicans* (CA) inattivata con mertiolato non è sensibilmente influenzato né dalla forma di crescita (lievito o micelio) né dalla natura della sorgente di carbonio nel terreno di crescita. Il  $\beta$ -glucano alcali-acido insolubile parietale, pur esso attivo in senso antitumorale, agisce probabilmente con meccanismi immunologici diversi da quelli evidenziati, in questi e precedenti studi, con cellule intere di CA.

**Summary** (Further Investigation on the Immunopotential of Antiblastic Therapy by Inactivated Yeasts and Glucan). - Several yeast species showed powerful immunoadjuvant, chemotherapy-synergic effect against a histocompatible, virus-induced, murine lymphoma. Sensitizing and booster intraperitoneal injections of  $2 \times 10^7$  yeast cells on days -14 and +1 (with respect to tumor challenge on day 0) followed by treatment with antiblastic drugs (on day +5) were required to elicit optimum activity. The anti-tumor effect was not markedly influenced by the form of growth nor by the nature of the carbon source in the growth medium. The insoluble  $\beta$ -glucan of the cell wall was confirmed to be a powerful immunoadjuvant in this model, though various data suggest that it could act in a way different from that of whole yeast cells.

## INTRODUZIONE.

*Candida albicans* (CA), un fungo dimorfo, patogeno opportunista per l'uomo, è stata oggetto di precedenti studi [1, 2] che hanno dimostrato la sua efficace azione come immunostimolante capace di indurre forti effetti antitumorali sinergici con la chemioterapia in modelli leucemici murini. Tali effetti antitumorali sono paragonabili a quelli del BCG [1, 3], immunoadiuvante classico, rispetto al quale si ha il vantaggio che CA è efficace anche dopo inattivazione chimica o fisica,

evitandosi così ogni rischio di infezione nell'ospite trattato.

Esperimenti con singole frazioni parietali di CA hanno suggerito l'ipotesi che il  $\beta$ -glucano alcali-acido insolubile possa essere il mediatore dell'effetto antitumorale della cellula stessa [2].

In questo lavoro sono stati affrontati problemi di natura squisitamente microbiologica riguardanti la eventuale influenza sul potere immunoadiuvante di CA di vari parametri microbici quali il ceppo, la forma di crescita, la sorgente di carbonio usata per la crescita. Inoltre, si è cercato di comprendere meglio il ruolo giocato dal  $\beta$ -glucano insolubile parietale nell'espressione dell'attività immunostimolante antitumorale.

## MATERIALI E METODI.

**Organismi, condizioni di crescita e frazionamento delle cellule.** - In questo studio sono stati usati vari ceppi di *Candida*, principalmente della specie *albicans* (Robin) Berkhout e poche altre specie di *Saccharomyces* e *Cryptococcus*. I ceppi, appartenenti alla collezione dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, sono stati riidentificati in base agli usuali criteri tassonomici [4]. Ove non sia diversamente specificato, comunque, tutti gli esperimenti si intendono eseguiti con il ceppo BP di CA, originariamente isolato da materiale patologico [1, 2, 5], cresciuto a 28° C in terreno di Winge a basso contenuto di glucosio. Indipendentemente dal particolare terreno di crescita usato, le culture venivano fatte crescere fino a raggiungere, in fase stazionaria, una densità di circa  $2 \times 10^8$  cellule/ml. Le cellule venivano quindi raccolte, lavate due volte in acqua distillata sterile ed inattivate con sodio mertiolato allo 0,01% come descritto altrove [1], e liofilizzate.

Per la preparazione dei ghosts glucanici [2, 6] usati in questo studio le cellule intere venivano sottoposte ad un procedimento di estrazione chimica con alcali e acidi descritto in precedenza [2].

Per valutare l'influenza della fonte di carbonio usata per la crescita sulla attività immunoadiuvante di CA, le sostanze prescelte come fonti di carbonio venivano

aggiunte ad una base salina avente la seguente composizione (g/l):  $KH_2PO_4$ , 5,7;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5; NaCl 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01;  $MnSO_4$ , 0,01;  $CaCl_2$ , 0,01; urea, 3,0; estratto di lievito, 1,0. Ove non sia diversamente specificato, le cellule venivano somministrate per via intraperitoneale (ip) nella dose di  $2 \times 10^7$ , corrispondente approssimativamente ad 1 mg di peso secco, in un volume di 0,2 ml.

Le forme miceliari di CA sono state ottenute sottoponendo a trasformazione ifale a 37°C in N-acetil-D-glucosamina [5, 7] cellule in forma lievito in fase stazionaria. La completa trasformazione avveniva in meno di 4 ore di incubazione. Le ife così ottenute venivano lasciate crescere per almeno 12-20 ore, poi raccolte e lavate in una base salina al fine di evitare la rottura per cause osmotiche dell'apice ifale. La quantità del materiale veniva misurata come peso secco.

**Tumore e modello animale.** - LSTRA, un linfoma ascitico indotto dal virus della leucemia di Moloney in topi Balb/c, era mantenuto in cavità peritoneale di topi Balb/c mediante trapianti settimanali ip di  $10^6$  cellule neoplastiche sospese in medium 199 (Microbiological Ass. Inc., Bethesda, Md., U.S.). Per gli esperimenti sono stati usati topi istocompatibili CD2F1 (Balb/c Cr  $\times$  DBA/2 Cr; H-2<sup>d</sup>/H-2<sup>d</sup>) di entrambi i sessi, dell'età di 2-4 mesi, offerti dalla Animal Production Section, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Md., U.S. La mortalità veniva registrata fino a 60 giorni dall'inoculazione del tumore e la presenza di ascite o linfoma generalizzato veniva confermata dall'autopsia. Il rallentamento o l'arresto della crescita tumorale erano valutati misurando la sopravvivenza media in giorni (MST) ed il numero di sopravvissuti a lungo termine (LTS) considerando tali i topi sopravvissuti oltre 60 giorni dall'inoculazione del tumore. La significatività statistica delle differenze nei tempi di sopravvivenza era valutata secondo il Mann-Whitney U test.

**Chemioterapici.** - 1,3 bis (2-cloroetil) 1-nitrosourea (BCNU) e 5-fluorouracile (5-FU) sono stati gentilmente offerti dal Dr. V.L. Narayanan, Drug Chemistry Branch, Division of Cancer treatment, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Md. I farmaci venivano disciolti in una soluzione di NaCl allo 0,85% immediatamente prima dell'uso ed iniettati ip nei topi nella dose prestabilita.

## RISULTATI.

I protocolli di trattamento adottati in questo lavoro sono stati messi a punto nel corso di precedenti studi [1, 2] e prevedono, al fine di ottenere effetti sinergici, condizioni molto stringenti riguardanti i tempi, le dosi e la via di somministrazione dell'immunoadiuvante e del chemioterapico [8]. Il trattamento con l'immunoadiuvante consiste in una somministrazione sensibilizzante al giorno -14 ed un booster al giorno +1 rispetto al giorno di inoculazione del tumore (giorno 0). La dose di CA in ciascuna somministrazione è di  $2 \times 10^7$  cellule, il LSTRA viene inoculato nella dose di  $10^6$  o  $10^8$  cellule, e infine la chemioterapia viene effettuata al giorno +5 (18 mg/kg di BCNU oppure 84 mg/kg di 5-FU). La via di somministrazione è l'intraperitoneale. La Tab. 1 riporta i risultati di un tipico esperimento realizzato usando come immuno-

Tabella 1. - Effetti antitumorali in un tipico esperimento nel modello istocompatibile LSTRA/CD2F1 soggetto a chemioterapia con BCNU ed immunostimolazione con cellule inattivate, in forma lievito, di *Candida albicans* (CA), ceppo BP, in condizioni ottimali.

Linfoma LSTRA ( $10^6$ cellule id al giorno 0)	CA ( $2 \times 10^7$ cellule ip ai giorni -14 e +1)	BCNU (a) (18 mg/Kg ip al giorno +5)	MST (b)	LTS (c) %
+	-	-	9	0
+	+	-	(d) 15	0
+	-	+	(e) 21	0
+	+	+	(e) > 60	75

(a) BCNU: 1,3 bis (2-cloroetil), 1-nitrosourea.

(b) MST: tempo medio di sopravvivenza in giorni.

(c) LTS: sopravvissuti a lungo termine.

(d) Significativo al 5%.

(e) Significativo all'1%.

adiuvante cellule (in forma lievito inattivate) del ceppo BP di CA. Rispetto al tumore non trattato, si nota un leggero ma significativo miglioramento nei gruppi trattati soltanto con CA ed uno ancora più significativo in quelli trattati soltanto con il chemioterapico, ma in nessuno dei due casi si hanno sopravvissuti a lungo termine. Invece nei gruppi sottoposti ad entrambi i trattamenti (CA e BCNU) si raggiunge un tempo medio di sopravvivenza maggiore di 60 giorni ed il 75% di sopravvissuti a lungo termine. È quindi evidente il realizzarsi di un forte sinergismo positivo antitumorale tra immunoadiuvante e chemioterapico. L'effetto antitumorale così ottenuto può essere ulteriormente potenziato mediante una terza somministrazione di CA effettuata al giorno +8, raggiungendosi il 100% di sopravvissuti a lungo termine. Vari lieviti inattivati (appartenenti ai generi *Candida*, *Saccharomyces*, e *Cryptococcus*) sono stati saggiate per la loro attività antitumorale e tutti sono risultati in grado di potenziare la chemioterapia nelle condizioni sperimentali già individuate, con gli stessi sostanziali risultati ottenuti in precedenza con il ceppo BP di CA. È di interesse il fatto che anche *Saccharomyces cerevisiae*, lievito non patogeno, può essere adoperato per questi trattamenti immunochemioterapici.

**Influenza di vari parametri cellulari sull'attività immuno-adiuvante antitumorale di CA.** - Per valutare l'eventuale influenza della sorgente di carbonio usata per la crescita sull'attività immunostimolante antitumorale di CA, cellule cresciute in terreni contenenti fonti di carbonio tra loro molto diverse sono state saggiate per la loro attività antitumorale, in combinazione o non con la chemioterapia, nelle condizioni e con le modalità precedentemente descritte. I risultati (Tab. 2) indicano chiaramente che la fonte di carbonio non influenza assolutamente l'espressione della loro attività antitumorale. Infatti tutte le preparazioni indistintamente, con la sola eccezione delle cellule cresciute in acido stearico, inducono effetti antitumorali fortemente positivi e tra loro simili.

Tabella 2. - *Influenza della sorgente di carbonio nel terreno di crescita sull'espressione dell'attività antitumorale di cellule di Candida albicans (CA) in combinazione con il chemioterapico 5-FU, nel modello LSTRA/CD2F1 (cellule tumorali: 10<sup>5</sup> somministrate ip).*

PREPARAZIONI DI CA	Gruppi non trattati con 5-FU (a)		Gruppi trattati con 5-FU (84 mg/Kg ip al giorno +5 dall'inoculazione del tumore)	
	MST (b)	LTS (c) %	MST	LTS %
—	11,0	0	16	0
CA-glucosio 1%.....	16,0	0	> 60	50
CA-glucosio 4%.....	15,0	0	> 60	50
CA-glucosio 10%.....	14,0	0	> 60	58
CA-galattosio 4%.....	15,5	0	> 60	50
CA-acido stearico 4%	12,0	0	19	0
CA-acido oleico 4%...	16,0	0	> 60	66
CA-glicerolo 4%.....	16,0	0	> 60	50
CA-glicol polietilenico 6.000 4%.....	15,5	0	> 60	66
CA-brodocoltura.....	15,0	0	> 60	50

(a) 5-FU: 5 fluorouracile.

(b) MST: tempo medio di sopravvivenza in giorni.

(c) LTS: sopravvissuti a lungo termine.

Al fine di valutare l'eventuale influenza della forma di crescita, lievito o micelio, sull'attività immunoadiuvante di CA, sono stati confrontati gli effetti antitumorali ottenuti mediante somministrazione di dosi crescenti (da 0,1 a 5 mg) delle due forme di crescita secondo i protocolli di trattamento già descritti. Le curve relative alle due forme di crescita (Fig. 1) presentano un andamento dose-dipendente molto simile, con un picco massimo di attività antitumorale per entrambe alla dose di 1 mg, ed i valori di MST e LTS raggiunti per le due forme risultano anch'essi tra loro piuttosto simili. Si può quindi concludere che neanche la forma di crescita determina nell'attività antitumorale di CA variazioni significative.

*Effetti antitumorali di cellule intere e ghosts glucanici somministrati separatamente o variamente abbinati.* - È chiaramente molto importante individuare quali siano i componenti cellulari responsabili dell'effetto immunoadiuvante osservato, anche al fine di utilizzare nel proseguimento degli studi componenti chimici ben caratterizzati. Si è quindi affrontato questo problema cominciando con l'indagare sull'attività dei componenti parietali delle cellule di CA.

Da precedenti esperimenti riguardanti il potere immunoadiuvante di frazioni della parete cellulare di CA [2] le frazioni solubili (frazione ricca di mannano e frazione glucano-proteica) erano risultate prive di ogni attività antitumorale, la frazione  $\beta$ -glucano alcali-acido insolubile (frazione particellata organizzata in ghosts glucanici contenente anche una piccola quantità di chitina) era risultata invece dotata di elevato potere immunoadiuvante, tanto da essere considerata

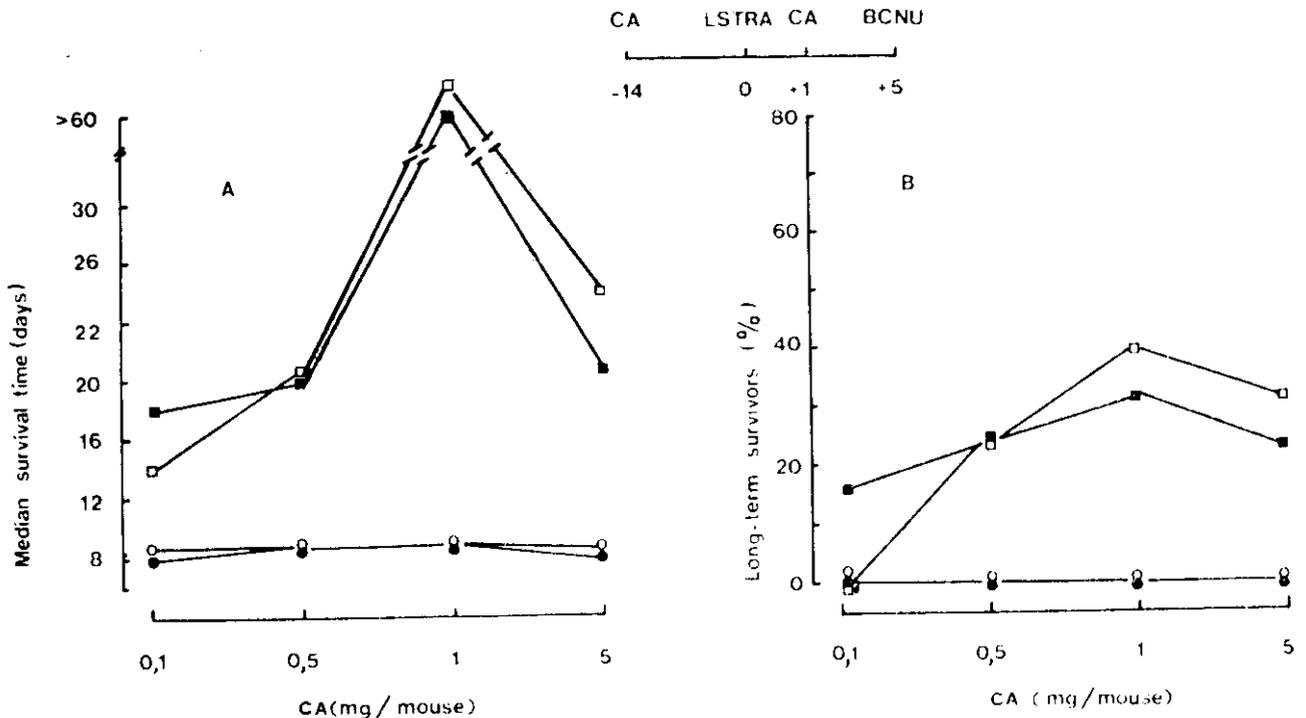


FIG. 1. - Attività immunoadiuvante antitumorale di due differenti forme (Y = lievito; M = micelio) di *Candida albicans* (CA) in combinazione con chemioterapia con BCNU in topi CD2F1 inoculati con 10<sup>6</sup> cellule LSTRA ip.

●—●: CA-Y ai giorni -14 e +1 ip.

○—○: CA-M ai giorni -14 e +1 ip.

■—■: CA-Y ai giorni -14 e +1 ip e BCNU, 18 mg/KG, al giorno +5.

□—□: CA-M ai giorni -14 e +1 ip e BCNU, 18 mg/KG, al giorno +5.

I topi inoculati soltanto con LSTRA avevano un tempo medio di sopravvivenza (MST) di 8 giorni e nessun sopravvissuto a lungo termine (LTS); i topi trattati soltanto con BCNU avevano un tempo medio di sopravvivenza di 14 giorni e nessun sopravvissuto a lungo termine

come il componente essenziale richiesto per l'espressione dell'attività antitumorale di CA. Si è quindi tentato di chiarire ulteriormente il ruolo di tale componente nell'espressione dell'attività antitumorale, cercando di individuare l'eventuale relazione esistente tra la sua attività e quella della cellula intera. Sono stati pertanto effettuati trattamenti con cellule intere (CA) e con glucano insolubile (CA-WG, wall ghosts) somministrati sia singolarmente che variamente abbinati, come si può vedere nella Tab. 3. La dose di glucano somministrata corrisponde alla quantità di esso presente nella dose somministrata delle cellule intere, cioè in 1 mg di cellule, in modo da ottenere risultati tra loro direttamente comparabili. Contrariamente a

quanto ci si sarebbe aspettato, i risultati ottenuti in questo esperimento hanno messo in evidenza per le due preparazioni comportamenti nettamente diversi. Infatti, il glucano, a differenza delle cellule intere, è in grado di potenziare fortemente la chemioterapia, anche se somministrato una sola volta al giorno —14; in secondo luogo, si può osservare che, mentre una prima somministrazione di cellule richiamata indifferentemente da cellule o da glucano dà i medesimi risultati altamente positivi, una prima somministrazione di glucano richiamata da glucano o da cellule appare assai meno efficace. Da tutto ciò si può dedurre che glucano e cellule intere agiscono coinvolgendo meccanismi immunologici probabilmente diversi tra loro.

Tabella 3. — Effetti antitumorali di cellule intere di *Candida albicans* (CA) e ghosts glucanici (CA-WG) in combinazione con BCNU nel modello LSTRA/CD2F1 (cellule tumorali: 10<sup>6</sup> somministrate ip).

Somministrazione di immunoadjuvante ai giorni		Gruppi non trattati con BCNU (a)		Gruppi trattati con BCNU (18 mg/Kg ip al giorno +5 dall'inoculazione del tumore)	
-14	+1	MST (b)	LTS (c) %	MST	LTS %
—	—	8	0	15	0
CA	—	9	0	17	0
CA	CA	11	0	> 60	50
CA	CA-WG	10	0	> 60	50
CA-WG	—	9	0	37	42
CA-WG	CA-WG	11	0	25	14
CA-WG	CA	11	0	27	0

(a) BCNU: 1,3 bis (2-cloroetil), 1-mitrosurea.

(b) MST: tempo medio di sopravvivenza in giorni.

(c) LTS: sopravvissuti a lungo termine.

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

Questi esperimenti hanno confermato ulteriormente il forte potere immunoadjuvante di *C. albicans* inattivata ed hanno dimostrato che tale attività antitumorale è comune a vari organismi lieviti, i quali possono essere efficacemente adoperati come immunopotenziatori della chemioterapia in modelli leucemici sperimentali. Si è inoltre dimostrato che tale attività non è influenzata dalle condizioni generali di crescita e forme di sviluppo, una volta che siano adottati appropriati protocolli di somministrazione del lievito stesso e del chemioterapico. Infine, contrariamente a quanto ipotizzato in precedenza, questi studi hanno rivelato che la cellula intera e il  $\beta$ -glucano insolubile parietale, entrambi dotati di elevata capacità immunostimolante antitumorale, agiscono con ogni probabilità attivando meccanismi immunologici tra loro diversi.

Ulteriori studi sono in corso, sia per chiarire la natura di questi meccanismi, sia per verificare la possibilità che altre strutture più semplici possano essere dotate di più elevato potere antitumorale.

Questo lavoro è stato finanziato in parte dal Contratto C.N.R. n. 80.01505.96 (Progetto Finalizzato «Controllo della crescita neoplastica»).

#### BIBLIOGRAFIA

- BISTONI, F., MARCONI, P., PITZURRA, M., FRATI, L., SPREAFICO, F., GOLDIN, A. & BONMASSAR, E. 1979. Combined effects of BCG or *Candida albicans* (CA) with antitumor agents against a virus-induced lymphoma in mice. *Eur. J. Cancer*. **15**: 1305-1314.
- CASSONE, A., MARCONI, P., BISTONI, F., MATTIA, E., SBARAGLIA, G., GARACI, E. & BONMASSAR, E. 1981. Immunoadjuvant effects of *Candida albicans* and its cell wall fractions in a mouse lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* **10**: 181-190.
- PEARSON, J. W., CHAPARAS, S. D. & CHIRIGOS, M. A. 1973. Effect of dose and route of bacillus Calmette-Guerin chemioimmunostimulation therapy of a murine leukemia. *Cancer Res.* **33**: 1845-1853.
- LODDER, J. 1970. *The Yeasts*. North Holland Publ. Co., Amsterdam, London.
- MATTIA, E. & CASSONE, A. 1979. Inducibility of germ tube formation in *Candida albicans* at different phases of yeast growth. *J. Gen. Microbiol.* **113**: 439-441.
- CASSONE, A., MATTIA, E. & BOLDRINI, L. 1978. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by Concanavalin A and its relationship to the distribution of mannian polymers and ultrastructure of the cell wall. *J. Gen. Microbiol.* **105**: 263-272.
- SIMONETTI, N., STRIPPOLI, V. & CASSONE, A. 1974. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*. **250**: 344-346.
- SPREAFICO, F. & BONMASSAR, E. 1980. Some aspects of the interaction between cancer, drugs and immunity. In: *Non-specific immunity in the prevention and treatment of cancer*. M. Sela (Ed.). Pontificia Academia Scientiarum Scripta Varia, Roma. **43**: 402-439.